

**ZUM VORKOMMEN VON STACHYBOTRYS ATRA
UND ANDEREN TOXINOGENEN MONILIALES
IN FUTTERMITTELN**

KIRSTI KAARINA LIUKKONEN

Disbui. München
1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554616_0013



Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter Leitung von Frau Prof. Dr. B. Gedek

ZUM VORKOMMEN VON STACHYBOTRYS ATRA
UND ANDEREN TOXINOGENEN MONILIALES
IN FUTTERMITTELN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Kirsti Kaarina Liukkonen
aus
Helsinki, Finnland
München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Zucker
Referent:	Prof. Dr. B. Gedek
Korreferent:	Prof. Dr. M.J. Forstner

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

Lehrplan Mathematik

1. Semester

Mathematik

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

1. Semester

2. Semester

2. Semester

2. Semester

2. Semester

2. Semester

2. Semester

2. Semester

3. Semester

3. Semester

3. Semester

THE
LIBRARY
OF THE
UNIVERSITY OF CHICAGO

1000 S. EAST ASIAN AVENUE
CHICAGO, ILL. 60607

1000 S. EAST ASIAN AVENUE
CHICAGO, ILL. 60607

Inhaltsverzeichnis

(A) EINLEITUNG	1
(B) SCHRIFTTUM	3
1. Taxonomie und mykologische Fachausdrücke	3
2. Genus <i>Stachybotrys</i>	7
2.1 Arten	7
2.2 Mykologische Daten	9
2.2.1 Wachstumsbedingungen	9
2.2.2 Makromorphologie	9
2.2.3 Mikromorphologie	13
2.2.3.1 Hyphen und Konidiophoren	13
2.2.3.2 Phialiden	13
2.2.3.3 Sporen	14
2.3 Vorkommen	20
2.4 <i>Stachybotryotoxikose</i>	23
2.4.1 Geschichtlicher Überblick	23
2.4.2 <i>Stachybotryotoxikose</i> des Menschen	24
2.4.3 <i>Stachybotryotoxikose</i> der Tiere	27
2.4.3.1 Pferd	27
2.4.3.2 Rind	30
2.4.3.3 Schaf	33
2.4.3.4 Schwein	36
2.4.3.5 Fleischfresser	39
2.4.3.6 Geflügel	39
2.4.3.7 Zootiere	41
2.4.3.8 Labortiere	42
2.4.4 Diagnosestellung	45
2.4.5 Prophylaxe und Therapie	46
2.4.6 Toxinwirkung	46
2.5 <i>Stachybotryotoxine</i>	48
2.6 Nachweisverfahren	52
3. Genus <i>Alternaria</i>	59
3.1 Arten	62
3.2 Mykologische Daten	62
3.3 Vorkommen	70
3.4 Krankheiten mit Beteiligung von <i>Alternaria</i> spp.	71
3.5 <i>Alternariatoxine</i>	79
3.6 Nachweisverfahren	81
4. Genus <i>Trichothecium</i>	84
4.1 Arten	84
4.2 Mykologische Daten	84

4.3 Vorkommen	87
4.4 Mykotoxikosen unter Beteiligung von <i>Trichothecium</i>	87
4.5 <i>Trichothecium</i> toxine	89
4.6 Nachweisverfahren	89
5. Genus <i>Scedosporium</i>	91
5.1 Arten	91
5.2 Mykologische Daten	91
5.3 Vorkommen und Bedeutung als Krankheitserreger	92
(C) EIGENE UNTERSUCHUNGEN	93
1. Material und Methoden	93
1.1 Art und Herkunft des Probenmaterials	93
1.2 Herkunft der <i>Stachybotrys atra</i> -Referenzstämme	95
1.3 Mykologische Untersuchungen	96
1.3.1 Prüfung der Eignung der Nährmedien für die Anzucht von <i>Stachybotrys atra</i>	96
1.3.2 Isolierung von Pilzstämmen aus dem Probenmaterial	98
1.3.3 Herstellung von Suspensionen zur Keimzahlbestimmung	98
1.3.4 Identifizierung	99
1.3.4.1 Kriterien für Identifizierung	99
1.3.4.2 Lichtmikroskopie	99
1.3.4.3 Elektronenmikroskopie	100
1.4 Toxikologische Untersuchungen	100
1.4.1 Kultivierung der Referenz-Stämme auf natürlichem Substrat	100
1.4.2 Kultivierung der Referenz-Stämme und Wildstämme auf Czapek Dox-Agar	101
1.4.3 Extraktion	101
1.4.4 Biologische Testverfahren	102
1.4.4.1 Hauttoxizitätstest	102
1.4.4.2 Zelltoxizitätstest	102
1.4.4.3 Mäusetoxizitätstest	106
2. Ergebnisse und deren Besprechung	107
2.1 Vorkommen von Pilzen unterschiedlicher systematischer Zugehörigkeit in Futtermitteln und anderen Untersuchungsmaterialien	107
2.2 Wachstum der <i>Stachybotrys atra</i> -Referenzstämme auf den verschiedenen Substraten	117
2.3 Isolierung von <i>Stachybotrys</i> -Wildstämmen	119
2.4 Gattung <i>Stachybotrys</i>	120
2.4.1 Ergebnisse der mykologischen Untersuchung	120
2.4.1.1 Bestimmung der Keimzahl nach Kulturabschwemmung	120
2.4.1.2 Makromorphologie	121
2.4.1.3 Mikromorphologie im Lichtmikroskop	124

2.4.1.4 Mikromorphologie im Elektronenmikroskop	140
2.4.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchung	145
2.4.2.1 Hauttoxizitätstest	145
2.4.2.2 Zelltoxizitätstest	147
2.4.2.3 Ergebnisse des Mäusetoxizitätstests	151
2.5 Gattung Alternaria	153
2.5.1 Ergebnisse der mykologischen Untersuchung	153
2.5.1.1 Bestimmung der Keimzahl nach Kulturabschwemmung	153
2.5.1.2 Makromorphologie	154
2.5.1.3 Mikromorphologie im Lichtmikroskop	155
2.5.1.4 Mikromorphologie im Elektronenmikroskop	161
2.5.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchung	165
2.5.2.1 Hauttoxizitätstest	165
2.5.2.2 Zelltoxizitätstest	165
2.6 Gattung Trichothecium	170
2.6.1 Ergebnisse der mykologischen Untersuchung	171
2.6.1.1 Bestimmung der Keimzahl nach Kulturabschwemmung	171
2.6.1.2 Makromorphologie	171
2.6.1.3 Mikromorphologie im Lichtmikroskop	173
2.6.1.4 Mikromorphologie im Elektronenmikroskop	179
2.6.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen	180
2.6.2.1 Hauttoxizitätstest	180
2.6.2.2 Zelltoxizitätstest	181
2.7 Scedosporium bzw. Petriellidium-Stamm	186
2.7.1 Ergebnisse der mykologischen Untersuchung	186
2.7.1.1 Makromorphologie	186
2.7.1.2 Mikromorphologie im Lichtmikroskop	187
2.7.1.3 Mikromorphologie im Elektronenmikroskop	188
2.7.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen	190
2.7.2.1 Hauttoxizitätstest	190
2.7.2.2 Zelltoxizitätstest	190
(D) DISKUSSION	191
(E) ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	195
(F) LITERATURVERZEICHNIS	199



(A) EINLEITUNG

Toxinogene Hyphomyceten sind in allen Klassen der höheren Pilze zu finden. Aufgrund ihres Vorkommens insbesondere im Boden und auf Pflanzen können sie auch in der Nahrung von Mensch und Tier angetroffen werden. Insofern es sich dabei um obligate Pflanzenparasiten handelt, die zu ihrer Vermehrung auf lebendes Gewebe angewiesen sind, entgehen sie bei der kulturellen Untersuchung des Keimgehaltes von Lebens- und Futtermitteln in der Regel einem Nachweis. Den Keimbesatz von Nahrungsmitteln repräsentieren demnach fakultative Parasiten und Saprobionten. Von diesen wiederum werden fast ausnahmslos nur die mesophilen Vertreter erfaßt, da die zur Keimzahlbestimmung beimpften Nährböden in der Regel bei Zimmertemperatur bebrütet werden. Von den Pilzen, die unter dieser Voraussetzung auf künstlich zusammengesetzten Nährböden zur Entwicklung gelangen, fanden in den letzten Jahren vor allem Hyphomyceten der Ordnung Moniliales mit hellfarbigem Myzel und zuweilen auch hyalinen Sporen Beobachtung, da sich unter ihnen Bildner sehr potenter Toxine, wie z.B. der Aflatoxine, befinden können. Darüber hinaus wurden Hyphomyceten mit dunkel und/oder braun bis schwarzen Sporen vernachlässigt, obwohl in der Literatur zahlreiche Hinweise zu finden sind, daß dergleichen Pilze der Familie Dematiaceae der Ordnung Moniliales über toxinbildende Eigenschaften verfügen und sich ihre Toxine für bestimmte Mykotoxikosen verantwortlich zeichnen sollen. Dazu gehört unter anderem die Stachybotryotoxikose der Haustiere und des Menschen, verursacht durch die Satratoxine des Zellulose abbauenden Pilzes *Stachybotrys atra*. Da diese Toxine die Aflatoxine in ihrer Giftigkeit noch übertreffen sollen, über das Auftreten der Mykotoxikose bei Haustieren aber bislang nur aus Ländern Osteuropas berichtet worden ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit das Augenmerk besonders auf diesen Pilz gerichtet sein. Zugleich war es meine Aufgabe bei der Untersuchung einer repräsentativen Zahl von Futtermitteln auf den Besatz mit mesophilen Pilzen auch Vertreter anderer toxinogener Arten der Familie Dematiaceae mitzuerfassen und die Stämme gegenüber ausgewählten biologischen Testobjekten hinsichtlich ihres Toxinbildungsvermögens zu überprüfen. Dabei sollte Beobachtung finden, ob gegebenenfalls morphologische Ver-



änderungen in der Kultur den Übergang von der Idiophase in die Trophophase und damit die Bildung von Sekundärmetaboliten zu erkennen geben.

(B) SCHRIFTTUM

1. Taxonomie und mykologische Fachausdrücke

Die Stellung der Gattungen *Stachybotrys*, *Alternaria*, *Scedosporium* und *Trichothecium* im Reich der Pilze (Fungi oder Mycota) kann der nachfolgenden Tabelle 1 entnommen werden:

Tabelle 1: Systematische Zugehörigkeit der Genera
Stachybotrys, *Alternaria*, *Scedosporium* und
Trichothecium.

REICH: MYCOTA	
1. Abteilung: Myxomycota, Schleimpilze	
2. Abteilung: Eumycota, echte Pilze	
1. Unterabteilung: Mastigomycotina	■
2. Unterabteilung: Zygomycotina	■
3. Unterabteilung: Ascomycotina	
4. Unterabteilung: Basidiomycotina	
5. Unterabteilung: Deuteromycotina (Fungi imperfecti)	
Klasse: Blastomycetes	
Klasse: Hyphomycetes	
Ordnung: Moniliales	
Familie: Dematiaceae	
Gattung: <i>Stachybotrys</i>	
Gattung: <i>Alternaria</i>	
Familie: Moniliaceae	
Gattung: <i>Trichothecium</i>	
Gattung: <i>Scedosporium</i>	
■ niedere Pilze	

Danach gehören die Vertreter dieser Gattungen zu den Fungi imperfecti. Zu den Fungi imperfecti oder Deuteromycotina zugeordnete Pilze haben die Fähigkeit zur Bildung der Hauptfruchtform entweder verloren, oder die Bedingungen, die sie für die Entwicklung von geschlechtlichen Vermehrungsformen benötigen, sind bis heute nicht bekannt. Wegen Fehlens dieses so wichtigen Kriteriums der geschlechtlichen Vermehrung, konnte keine Einordnung der Pilze aufgrund phylogenetischer Gesichtspunkte erfolgen (Gedek, 1980).

Stattdessen mußten andere Gemeinsamkeiten für eine künstliche Einteilung herangezogen werden.

Bei den Familien Dematiaceae und Moniliaceae werden die Konidien an nicht organisierten Konidienträgern erzeugt. Als Kriterium zur Einteilung in diese beiden Familien dient die unterschiedliche Färbung der Konidien und Hyphen. Die Dematiaceae bilden, im Unterschied zu den hyalinen Vegetationskörpern und Konidien der Moniliaceae, dunkel gefärbte Hyphen und/oder Fruktifikationsorgane (Gedek, 1980).

Die nachfolgende Tabelle 2 dient zur Erläuterung der in dieser Arbeit verwendeten Fachausdrücke.

Tabelle 2: Mykologische Fachausdrücke

Ascus:	Ein Sporensack der Ascomyceten, in dem nukleäre Fusion und Meiose der Sporenbildung vorgeschaltet ist.
Ascospore:	Eine Spore, die in einer sackähnlichen Zelle, den Ascus gebildet wird.
acropetales Wachstum:	Sporen, die aufeinanderfolgend gebildet werden und wobei der jüngste an der Spitze zu liegen kommt (die Abgliederung erfolgt von der Spitze zur Basis hin).
basipetales Wachstum:	Entwicklung geschieht von der Basis aus wobei der apikale Teil den älteren Teil darstellt und die jüngste Spore an der Basis zu liegen kommt.
Chlamydosporen:	Dickwandige, resistente, asexuelle Sporen, die oft als Dauerorgane angesehen werden.
Cleistothecien:	Ein geschlossener Fruchtkörper ohne Öffnung, der Asci beinhaltet.
funikulös:	Hyphen vereinigen sich zu zerstreuten Bündeln.
Gangliospore:	Eine dickwandige, terminale Spore (Aleuriospore) aber keine Chlamydospore.
Hauptfruchtform=perfekte Form=Teleomorphe:	Die sexuelle Fruktifikation im vollständigen Entwicklungsgang.

Fortsetzung Tabelle 2:

Hyphen=fädige Vegetationsorgane= Sproßzellen

Konidien: Für höhere Pilze charakteristische, asexuelle, sich nicht bewegende Verbreitungsorgane.

Konidiophore=Sporophore: Konidien tragende Hyphen.

Konidiogene Zelle=Sporenmutterzelle= sporogene Zelle=bei Stachybotrys die Phialiden: Zellen, die Konidien produzieren.

Kragen=Collarette: Kelchartige Struktur, die an der Spitze sporogenen Zellen bei den Phialosporae gefunden werden kann.

Luftthyphen. von Substrathyphen aufragende Seitenzweige.

makronematös: Konidiophoren, die sich morphologisch sehr von den vegetativen Hyphen unterscheiden.

mikronematös: Vegetative Hyphen sind den Hyphen, die Konidien tragen sehr ähnlich.

mononematös: Konidiophoren liegen einzeln oder in Büscheln oder Bündeln

monovercillate: Sporogene Zellen sind zu einzelnen Trauben an der Spitze der Konidiophore angeordnet.

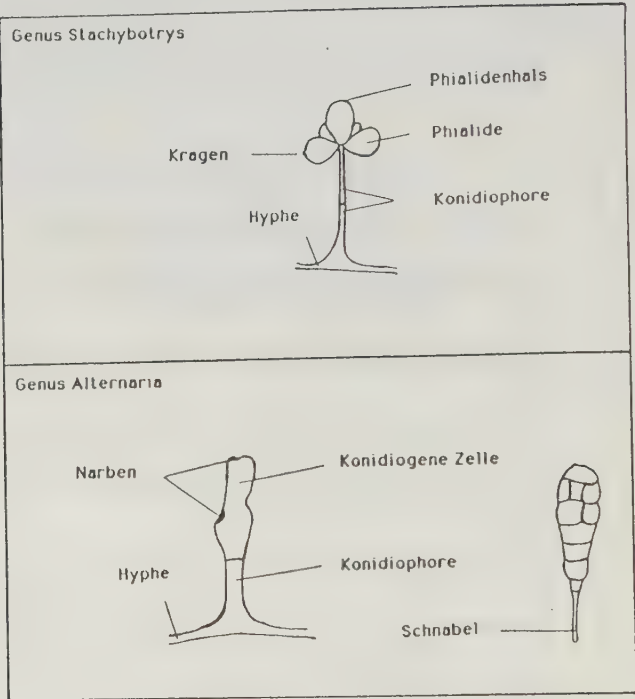
Nebenfruchtform=Imperfekte Form=Anamorphe: Die asexuelle (nicht geschlechtliche) Vermehrung.

Porospore. Eine Spore, die in kurzer Zeit durch eine Pore in der Wand der sporogenen Zelle oder Hyphe gebildet wird.

Spore: Eine Zelle oder Zellen, die zur Verbreitung und Reproduktion bestimmt sind.

Substrathyphen: Sämtliche Zellen haben Kontakt mit dem Nährmedium.

Fortsetzung Tabelle 2:



Zusammengesellt nach FUNDER (1958), BARRON (1968),^{*} GEDEK (1980), und MÜLLER und LOEFFLER (1982).

2. GENUS STACHYBOTRYS

2.1 Arten

Stachybotrys atra (botryoid = traubenartig, atrabiliaris = trübsinnig, schwermütig) wurde zuerst von CORDA (1837) beschrieben und benannt. 1851 stellte BONORDEN *S. alternans* (*alternans* = veränderlich, unbeständig) vor. Eine ausführliche Beschreibung der Gattung *Stachybotrys* wurde von BISBY (1943) vorgenommen, in dem er die in der Literatur zu jener Zeit über 20 existierenden Arten zu zwei, eindeutig voneinander sich unterscheidenden Spezies, *S. atra* und *S. subsimplex* COOKE zusammenfaßte (zit. JONG und DAVIS, 1976).

Es existierten trotz allem noch viele Synonyme, die immer wieder Verwirrung in der Bestimmung von Arten dieser Gattung verursachten. In der östlichen Literatur waren hauptsächlich *S. alternans*, in der westlichen *S. atra* gebräuchlich und manche Pflanzenpathologen verwendeten stattdessen *S. chartarum* (*charta* = Papier) (EHRENBERG ex LINK) HUGHES (zit. KORPINEN, 1974).

Hyalostachybotrys wurde von SRINIVASAN (1958, zit. BARRON 1964) als eigene Gattung für zwei *stachybotrys*-ähnliche Pilze vorgeschlagen. Barron (1964) dagegen sah dieses als Synonym für *Stachybotrys* an, da er der Meinung war, daß eine Trennung durch die Farbe der Konidien keine taxonomische Gültigkeit aufweise. JONG und Davis (1976) haben die, in der Tabelle 3 aufgezählten *Stachybotrys*-Arten unterschieden.

Diese Unterscheidung wurde aufgrund der Wachstumsdifferenzen auf Getreidemehl-Agar vorgenommen mit Ausnahme von *S. theobromae*, der auf Kartoffel-Dextrose-Agar kultiviert wurde.

Von einem Vertreter der Gattung *Stachybotrys* existiert auch eine perfekte Form. Es handelt sich um den Ascomyceten *Melanopsamma pomiformis* (PERS. ex FR.) SACC., dessen konidienbildenden Nebenfruchtform nach mehreren Umbenennungen der Name *Stachybotrys socia* zuerkannt wurde (zit. JONG und DAVIS, 1976).

Tabelle 3: Stachybotrys-Arten nach JONG und DAVIS (1976).

Arten	Referenzen
<i>S. atra</i>	CORDA, 1837 Icon Fung., 1, 21
<i>S. bisbyi</i>	(SRINIVASAN) BARRON, 1964. Mycologia, 56, 315
<i>S. theobromae</i>	HANSF., 1943 Proc Linn Soc London, 155, 45
<i>S. albipes</i>	(BERK. & BR.) JONG und Davis, comb. nov.
<i>S. microspora</i>	(MATHUR & SANKHLA) JONG und DAVIS comb. nov.
<i>S. cylindrospora</i>	JENSEN, 1912 Cornell Univ. Agr. Exo. Sta. Bull., 315, 496
<i>S. parvispora</i>	HUGHES, 1952 CMI Mycol. Papers, 48, 74
<i>S. nephrospora</i>	HANSFORD, 1943 Proc Linn Soc London, 155, 45
<i>S. oenanthes</i>	ELLIS, M. B., 1971 CMI Mycol. Papers, 125, 29
<i>S. dichroa</i>	GROYE, 1886 J. Bot. Lond., 155, 45
<i>S. kompalensis</i>	HANSFORD, 1943 Proc Linn Soc Lond., 155, 45
Nach MIYAZAKI et al. (1980) außerdem noch <i>S. complementi</i>	

Meinungsverschiedenheiten gab es auch bei der Zuordnung der Vertreter der als eigene Gattung anzusehenden *Memnoniella* (HÖHNEL, 1923; ZUCK, 1949; PADWICK, 1945; DEIGHTON, 1960; MATSUSHIMA, 1971a und b, 1975; ELLIS, 1971a; zit. JONG und DAVIS, 1976), da diese morphologisch der Gattung *Stachybotrys* ähnelten. Nicht alle Autoren waren sich einig, ob es gerechtfertigt sei, die hauptsächlich an der unterschiedlichen Anordnung der Sporen zu erkennenden Arten in zwei separaten Gattungen einzuordnen, denn ZUCK (1946) berichtete über Isolate, deren Morphologie einer Übergangsform zwischen diesen beiden Gattungen entsprach. *Memnoniella* spp. bilden ihre Phialokonidien basipetal und reihen diese durch ein gemeinsames Septum zu langen Ketten aneinander, während *Stachybotrys* schleimige Massen von Sporen entwickelt (JONG und DAVIS, 1976).

Um das in der Literatur bestandene Durcheinander der verschiedenen Arten mit ihren vielen Synonymen aufzuklären, stellten JONG und DAVIS (1976) für jede Art eine Liste von Synonymen zusammen, aus der die Vielfalt der verschiedenen Benennungen hervorgeht und damit der Grund für die Verwirrung offensichtlich wird. Als ein Beispiel für die Vielzahl von Benennungen ist die Liste der *S. atra*-Synonyme in Tabelle 4 aufgeführt.

2.2 Mykologische Daten

2.2.1 Wachstumsbedingungen

Stachybotrys atra ist anspruchslos und wächst auf einem synthetischen Medium nur bestehend aus Glucose, Biotin und anorganischen Salzen (MARSH und BOLLENBACHER, 1946). Er gedeiht im Temperaturbereich zwischen 2-40 °C, mit einem Wachstumsoptimum bei 20-25 °C (mesophil), zeigt eine geringe Empfindlichkeit gegenüber pH-Schwankungen (6,5-8,0 Optimum; CURRAN 1980) und ist aufgrund der dunklen Konidien sehr resistent gegenüber UV-Strahlung (OHFF und WEIßBACH, 1984).

Nach PERLMAN (1948) wirkten Fe, Zn und Mn wachstumsfördernd, Ni, Co, Cr und Al dagegen wachstumshemmend auf *S. atra*. Als Kohlenstoffquelle kann der Pilz über 20 verschiedene Zucker und Zuckerderivate verwerten, wobei er am besten auf einem Medium mit Saccharose wächst. McQUADE (1963) zeigte, daß die Glucosekonzentration des Mediums eine Wirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit und auf die Sporulationsintensität ausübt und erzielte mit einem bestimmten KH₄CL/KH₂PO₄-Verhältnis ein völlig steriles Myzel.

2.2.2 Makromorphologie

Die Kolonien der Arten der Gattung *Stachybotrys* sind flach und normalerweise schwarz oder schwarz-grünlich. Es wird sowohl Substratmyzel als auch Luftmyzel gebildet, wobei das Myzel manchmal strangartige Hyphenbündel aufweist (ELLIS, 1971). Über Unterschiede in der Makromorphologie der verschiedenen *Stachybotrys*-arten informiert Tabelle 5.

Tabelle 4: *Stachybotrys atra* Synonyme (JONG und DAVIS 1976).

<i>Stachybotrys atra</i>	CORDA, 1837 Icon. Fung., 1, 21
= <i>Stilbospora chartarum</i>	(EHRENB., SYLYAE, 1818 Myc. Berol., 21, 9
= <i>Oidium chartarum</i>	EHRENB. ex LINK, 1924 Linn. Spec. Plant., IV, 6, 1, 124
= <i>Oospora chartarum</i>	(EHRENB. ex LINK) WALLR., 1833: Flora Crypt. German., 2, 164
= <i>Stachybotrys chartarum</i>	(EHRENB. ex LINK) HUGHES, 1956: Can. J. Bot., 36, 812
= <i>Aspergillus alternans</i>	BERK., 1838 Ann. Mag. Nat. Hist., 1, 262
= <i>Sporocybe lobulata</i>	BERK., 1841 Ann. Mag. Nat. Hist., 6, 434
= <i>Stachybotrys lobulata</i>	(BERK.) BERK., 1860: Outlines Brit. Fung., 343
= <i>Synsporium biguttatum</i>	PREUSS, KLOTZSCHII, 1849 Herb. Viv. Mycol., 1285
= <i>Stachybotrys alternans</i>	BON., 1851: Handb. Myc., 117, 185
= <i>Memonium sphaerospermum</i>	FUCKEL, 1870 Symb. Mycol., 358
= <i>Stachybotrys scabra</i>	COOKE und HARKNESS, 1884: Grevillea, 12, 96
= <i>Stachybotrys asperula</i>	MASSEE und COOKE, 1887: Grevillea, 16, 26
= <i>Stachybotrys verrucosa</i>	COOKE und MASSEE, 1888 Grevillea, 16, 102
= <i>Stachybotrys artrogrisea</i>	ELLIS und EV., 1888: J. Mycol., 4, 106
= <i>Trichosporum effusum</i>	(CORDA) SACC. subsp. binucleatum, KARST., 1890 Medwigia, 29, 272
= <i>Stachybotrys gracilis</i>	EM. MARCH., 1894: Bull. Soc. Belg. Micro., 7, 265
= <i>Stachybotrys pulchra</i>	SPEG., 1896: Rev. Agr. y Veter. La Plata, 248
= <i>Stachybotrys elasticae</i>	KOORD., 1907: Botan. Untersuch. Java Pilze, 227
= <i>Stachybotrys dakotensis</i>	SACC., 1917: Atti Mem. R. Acad. Sci., Lett., Arti, Padova., 33, 1974
= <i>Stachybotrys volginii</i>	CIF., 1922 Ann. Mycol., 20, 48

Tabelle 5: Unterschiede der Kolonienmorphologie der verschiedenen *Stachybotrys*-Arten nach JONG und DAVIS (1976)

Art	Durchmesser der Kolonien cm			Oberfläche		Farbe		Randzone	Konidienbildung	
	2 Wo	3 Wo		Ohne Sporen	Mit Sporen	Ohne Sporen	Mit Sporen		Zeit (Wo)	Besonderheiten
<i>S. albipes</i>	●	2		flaumig, gleichmäßig dicht	granuliert	farblos od. weiß	dunkel olivgrün	deutlich	1	erst in der Mitte der Kolonie, sich zentrifugal zum Rand hin ausbreitend
<i>S. bisbyi</i>	●			flaumig gleichmäßig dicht	puderartig, flaumig	weiß	bläß grau bis lachsrot	undeutlich	1	reichlich; Kulturen scheinen die Fähigkeit zur Konidienbildung mit wiederholtem Überimpfen zu verlieren
<i>S. atra</i>		●		flach gleichmäßig dicht	puderartig, flaumig	farblos	schwarz	deutlich	3. Tag	
<i>S. cylindrospora</i>		●		flaumig bis filzig	granuliert	farblos	dunkel	undeutlich	1	
<i>S. dichroa</i>		2		flaumig		Kehrseite: gelblich rosa		undeutlich		
						orange	orange			
						Kehrseite: orange				sparlich, auf zentrale Teile der Kolonie beschränkt; Kulturen scheinen die Fähigkeit zur Konidienbildung mit wiederholtem Überimpfen zu verlieren

● = die gesamte Petrischale ausfüllend

Fortsetzung Tabelle 5:

Art	Durchmesser der Kolonien cm		Oberfläche		Farbe		Randzone	Konidienbildung	
	2 Wo	3 Wo	Ohne Sporen	Mit Sporen	Ohne Sporen	Mit Sporen		Zeit (Wo)	Besonder- heiten
<i>S. kampalensis</i>	3		flach gleichmäßig dicht	flaumig	farblos	dunkel bis schwarz	deutlich	3 Tag	
<i>S. microspora</i>			flach gleichmäßig dicht	puderartig flaumig		zentral dunkel bis schwarz	undeutlich		reichlich, aber in die Mitte der Kolonie be- schrankt
<i>S. nephrospora</i>		4-5	flach gleichmäßig dicht	granuliert	farblos	dunkel	deutlich, weiß	1	erst in der Mitte, dann zentrifugal sich zum Rand hin aus- breitend → Zonenbildung
<i>S. oenanthes</i>	3		flaumig	granuliert	orange	von Zentrum her dunkel werdend		1	
<i>S. parvispora</i>		4	filzig bis seidenartig		Kehrseite: orange	olivgrün	deutlich weiß	1	
<i>S. theobromae</i>			wollig bis samartig, unterschied- lich dicht	granuliert	Kehrseite: leicht weiß schimmernd	orange dunkel	deutlich gelappt	2	
<i>S. crassa</i>					Kehrseite: erst ungefarbt, später olivfarben				
noch nicht als eigene Art anerkannt, da nur ein Stamm bekannt ist									
<i>S. complementi</i> (MIYAZAKI et al. 1980)	30 Tage	60-70mm	dünn, flach		farblos bis leicht oliv- farben				

2.2.3 Mikromorphologie

2.2.3.1 Hyphen und Konidiophoren

Die Konidiophoren unterscheiden sich deutlich von den vegetativen Hyphen (makronematös). Je nach Art sind die Konidiophoren ein- oder mehrfach septiert, wachsen aufrecht, stehen einzeln oder bilden Gruppen, sind gerade oder leicht gebogen, hyalin oder dunkel gefärbt und besitzen eine glatte oder raue Oberfläche. Die Basalzelle ist normalerweise leicht aufgebläht und verjüngt sich zur Spitze hin. Die letzte Zelle am freien Ende der Konidiophore, an der es auch zur Phialidenbildung kommt, ist oft zur Spitze hin ein wenig verdickt. Das Längenwachstum ist nach Bildung der ersten terminalen Spore abgeschlossen. (JONG und DAVIS, 1976; ELLIS, 1971).

Bei der Untersuchung der Ultrastruktur von *S. atra* zeigt sich, daß die Konidiophore die normalen Zellorganellen enthält, einschließlich des Kerns, der sehr langgestreckten Mitochondrien, des endoplasmatischen Reticulums und der Ribosomen (CAMPBELL, 1972).

2.2.3.2 Phialiden

Die konidiogenen Zellen, Phialiden, von *S. atra* werden an der Spitze des freien Endes der Konidiophore gebildet. Es kommt zur Anschwellung des Gipfelpunktes und der Bildung eines Septums das die Begrenzung der ersten, normalerweise zentralen Phialide, erkennen läßt. Neue Wachstumspunkte bilden sich unterhalb des Septums, von denen aus die anderen Phialiden der Gruppe geformt werden. Die Septen besitzen an ihrer Verbindungsstelle eine zentrale Pore (CAMPBELL, 1972).

Die Menge der gebildeten, einzelligen Phialiden ist variabel. Diese sind hyalin oder gefärbt, besitzen eine glatte Oberfläche und weisen Krägen auf. Ihre Anordnung gleicht einem Wirtel, indem eine Phialide zentral zu liegen kommt und von den anderen umgeben ist. Das Längenwachstum der Phialiden ist nach Bildung der ersten terminalen Spore abgeschlossen (JONG und DAVIS, 1976). (vgl. Abbildung 1)

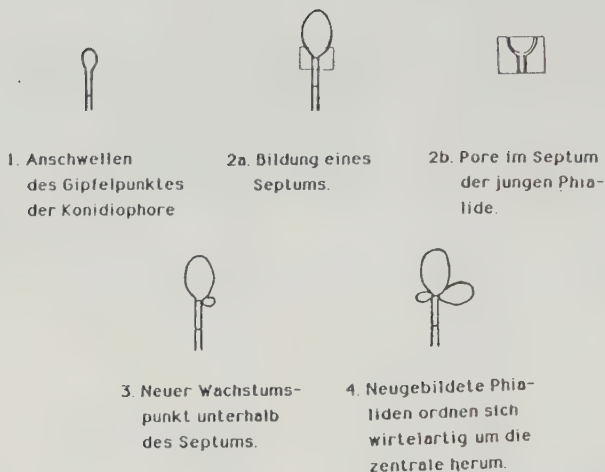


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Phialidenbildung (modifiziert nach CAMPBELL, 1972)

Die jungen Phialiden von *S. atra* besitzen einen Kern und ein endoplasmatisches Reticulum (CAMPBELL, 1972).

2.2.3.3 Sporen

Die erste Spore bildet sich im Phialidenhals aus der inneren Schicht der Wand heraus und durchbricht die äußeren Wandschichten in der Nähe des Halses. Manchmal sind noch Teile der Phialidenwand an der Spitze der entwickelten, von Schleim umgebenen Spore zu erkennen (CAMPBELL, 1972).

Nach Entwicklung der ersten Spore bilden sich weitere durch Produktion von Material auf der Wandinnenseite in der Phialidenhalsgegend. Die neugebildete Spore gewinnt schnell an Größe und wird zweischichtig, behält aber ihre Verbindung zur Innenwand des Phialidenhalses bis fast zur völligen Reife. Das Wachstum der

Spore wird mit der Bildung eines Septums an der Basis abgeschlossen. Eine Plasmalemmainvagination bildet sich am Phialidenhals und breitet sich zentripetal aus, bis der Verschluß komplett ist. In dieser Phase löst sich die Spore von der Phialide, wobei das Septum in zwei Lagen gespalten wird. Eine Lage bildet die Basis der Spore die andere überzieht die Öffnung der Phialide (CAMPBELL, 1972). (vgl. Abbildung 2)

Die nächste Spore von *S. atra* wird von einer neuen Wandschicht im Phialidenhals gebildet. Infolgedessen ist die Verdickung am Hals, die oft schichtenweisen Aufbau zeigt, je dicker desto mehr Sporen an der Phialide produziert wurden (CAMPBELL, 1972). (vgl. Abbildung 3)

Die erste Spore unterscheidet sich von den später gebildeten Sporen, indem sie die Wand der Phialidenspitze einbezieht (Kendrick, 1971). Die äußere Schicht der Phialide beteiligt sich nicht bei der Bildung der Sporen. (zit. CAMPBELL, 1972).

S. atra bildet dickwandige, resistente Sporen (Clamydosporen), die von schleimigen Massen zusammengehalten werden (BARRON, 1968).

Die Sporenwand ist zweischichtig, wobei die äußere Lage vermutlich Melanin enthält und eine raue Oberfläche aufweist. Eine abgestumpfte Sporenbasis ist an der Stelle, an der das Septum von der Phialide getrennt wurde, augenfällig. Ein deutlicher Kern wird gebildet und viele Sporen enthalten Lipidtröpfchen. Die äußere Fläche des Plasmalemmas ist gefurcht und entsprechende Rillen sind auch auf der inneren Fläche zu erkennen, deren Funktion bis heute nicht bekannt ist (CAMPBELL, 1972). Die mikroskopischen Unterschiede der verschiedenen *Stachybotrys*arten werden in Tabelle 6 näher erläutert.

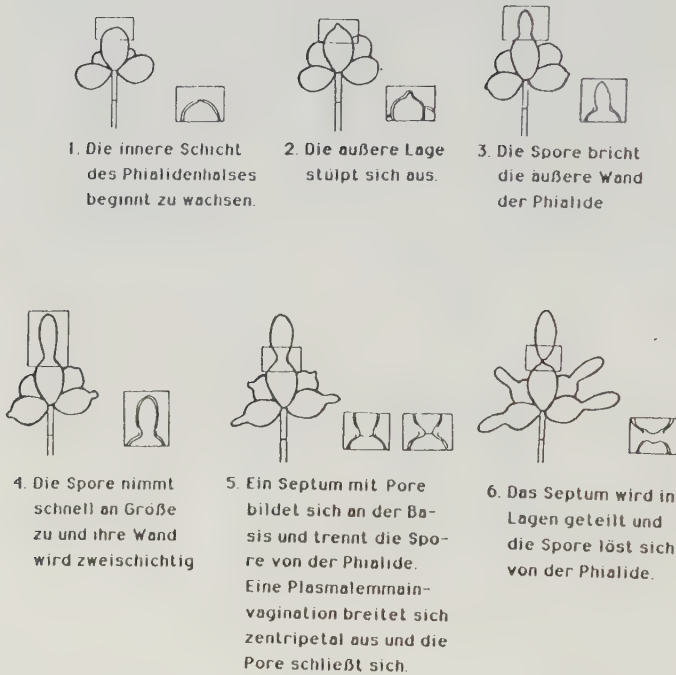


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Sporenontogenese (modifiziert nach CAMPBELL, 1972)

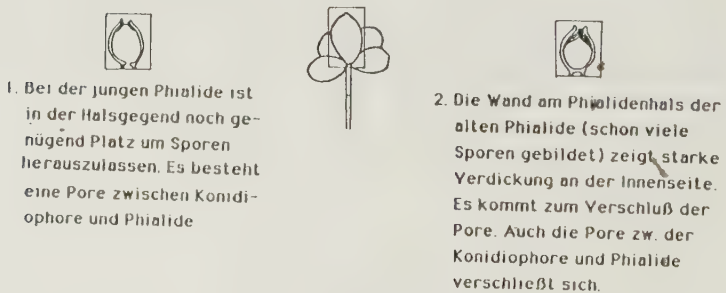


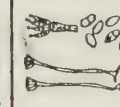
Abbildung 3: Unterschiede einer jungen und alten Phialide schematisch dargestellt (modifiziert nach CAMPBELL, 1972).

Tabelle 6: Mikroskopische Differenzierungsmerkmale der verschiedenen Stachybotrys-Arten (modifiziert nach JONG und DAVIS, 1976)

Art	Konidiophoren				Phialiden			Konidien				
	Farbe	Septen	Größe Länge µm	Breite µm	Menge	Farbe	Größe µm	Kragen	Farbe	Oberfläche	Form	Größe µm
 <i>S. chartarum</i> = <i>atra</i> = <i>alternans</i>	Basis hyalin Spitze: dunkel olivfar- ben	2-4	bis zu 1000	3-6	4-10	erst: hyalin später: dunkel oliv	9-14x 4-6	deutlich	jung: hyalin reif: dunkel olivgrau, mehr od. weniger undurchsichtig	glatt, dünn beschichtet od. gefurcht	ellipsenför- mig	7-12x 4-6
 <i>S. cylindrospora</i> = <i>atra</i> var. <i>cylin-</i> <i>drospora</i> (Jensen)	Basis hyalin Spitze: olivfar- ben	3-5	bis zu 200	3-5	4-10	Spitze: dunkel oliv- farben	11-16 x 4-5	deutlich	jung: hyalin reif: dunkel olivgrau	jung: glatt reif: in der Längsachse zart gestreift normalerwei- se 2 Öltröpf- chen	zylindrisch	13-16 x 4-6
 <i>S. microspora</i> = <i>atra</i> var. <i>micro-</i> <i>spora</i> (Jensen & Sankhila)	Spitze unregel- mäßig olivfar- ben	-	bis zu 55	2-4	3-7	leicht dunkel oliv- farben	8-9x 4-5	deutlich	reif: dunkel olivgrau, mehr od. weniger undurchsichtig	grobkörnig rauh	jung: ellip- senförmig od. birnenförmig reif: mehr ku- gelförmig D=5-6µm	6-8x 4-5
 <i>S. nepthospora</i>	jung hyalin obere Teile später olivfar- ben	2-4	bis zu 400	3-5	5-10	oliv- farben	10-12 x 5-6	deutlich	jung: hyalin reif: dunkel olivfarben, mehr od. we- niger un- durchsichtig	jung: glatt reif: grob- körnig rauh	nieren- od. kommaför- mig	10-12 x 4-5

- = nicht angegeben

Fortsetzung Tabelle 6:

Art	Konidiophoren				Phialiden				Konidien				Größe µm
	Farbe	Septen	Größe Länge µm	Breite µm	Menge	Farbe	Größe µm	Kragen	Farbe	Oberfläche	Form		
 <i>S. oenanthae</i>	rauch- grau bis schwarz	1-2	bis zu 190	5-7	9-21	rauch- grau bis schwarz	10-20 x 5-7	deutlich	jung hyalin reif rauch- grau bis schwarz	jung glatt reif stark verrukos	ei- bis nie- renförmig, manchmal schief ver- längert an der Basis	9-10x 5-7	
 <i>S. perispora</i>	hyalin	3-5	bis zu 200	2-5	5-11	hyalin	8-11x 3-4	deutlich	jung hyalin reif dunkel olivgrau, mehr od. weniger undurchsichtig	grobkörnig rauh	eiförmig	5-6x 3-3,5	
 <i>S. theobromae</i>	hyalin	6-14	bis zu 400	3-5	4-5	hyalin	15-23 x 4-5	deutlich	jung hyalin reif dunkel- grün, mehr od. weniger un- durchsichtig	jung glatt reif grob- körnig rauh	oval	16-28 x 12-16	
 <i>S. albipes</i>	-	-	-	3-7	7-11	hyalin	9-16x 3-5	unauf- fällig	jung hyalin reif dunkel olivgrau	glatt	eiförmig	4-12x 3-6 meist 7-9x 5-6	

2.3 Vorkommen

Stachybotrys atra ist ein kosmopolitischer Saprophyt. Er wird häufig von zellulosereichen Materialien, insbesondere von Heu, Stroh, und Streu isoliert. Er kommt aber auch in Futtermitteln anderer Art vor (EPPLEY, 1977). Bevorzugt werden welkende, abgestorbene oder faulende Pflanzenteile durch diesen Pilz besiedelt (OHFF und WEIDBACH, 1984).

Das Wachstum von *S. atra* auf Pflanzenresten zeigt sich durch die Bildung einer rußartigen, schwarz gefärbten Schicht, die leicht zu entfernen ist. Die toxischen, schwarzen Konidien sind an der Oberfläche von kontaminiertem Material bereits bei geringer lichtoptischer Vergrößerung zu erkennen; bei stärkerer Vergrößerung erscheinen charakteristische, ovalförmige Gebilde (PALYUSIK, 1982).

Da andere Pilze normalerweise viel schneller auf den üblichen Pilznährböden wachsen und sukzessive *Stachybotrys* überwuchern, entgeht er in der Regel bei der mykologischen Untersuchung einem Nachweis (EPPLEY, 1977).

In einer Routineuntersuchung in Finnland isolierten KORPINEN und UOTI (1974) 50 (7%) *S. alternans* (BON., 1851) Stämme von 725 Getreide-, Feldbohnen-, Hafermehl-, Futter- und Trockenfutterproben. Dabei betrug der Anteil von *S. alternans* an Proben, die mykotoxinverdächtig waren 17%.

MAZEN und seinen Mitarbeitern gelang es 1984 in Ägypten aus 30 Getreideproben auf Zellulose-Czapek-Agar 13 *Stachybotrys*-Stämme zu isolieren.

Auch ABDEL-HAFEZ wies (1984) unter 10 untersuchten Gerste-, Mais-, Shorgum- und Weizenproben einen *S. chartarum*-Stamm (EHRENBERG ex LINK) HUGHES in Weizen nach.

ABDEL-HAFEZ und SHOREIT (1985) untersuchten 20 Staubproben auf ihre Pilzflora. Den Staub sammelten sie auf Häuser- und Taxidächern. Aus diesen Proben isolierten sie 16 *S. chartarum*-Stämme (EHRENBERG ex LINK) HUGHES auf Zellulose-Agar und 4 auf Glucose-Agar.

Tabelle 7 gibt Auskunft über Art und Herkunft der Materialien, in denen *Stachybotrys*-Arten gefunden wurden.

Tabelle 7: Beispiele für Fundorte von *Stachybotrys*

Art	Substrat	Land	Referenzen
S atra	Boden	Kanada	BARRON, 1961
		Ägypten	ELNAGY et al., 1976
		U.S.A.	SAYAGE et al., 1969
	Wurzeln der Baumwollpflanze	Pakistan	GHAFFAR und PARVEEN, 1968
		Kanada	ASHWORTH, 1971
	Baumwollreste	England	WALSH, 1971
	Rizinus-körner	Indien	JAIN und PATEL, 1969
	Exkremente	Pakistan	AHMED und ASAD, 1971
	Ölbilder	Rumänien	IONITA, 1971
	Stroh	DDR	OHFF und WEIßBACH, 1984
		Ungarn	HARRACH et al. 1981, 1983
			DATA et al., 1985
S. charta- rum	Boden	BRD	zit MARTIN und HAIDER, 1969
	Luft	BRD	BONDIETTI et al. 1971
		Ägypten	ABDEL-HAFEZ und SHOREIT, 1985
S. alternans	Getreide, Erbsen,	Finnland	KORPINEN und UOTI, 1974
			KORPINEN et al., 1974
	Steinmonumente	Rumänien	IONITA, 1971
S micro- spora	na		MATHUR und SANKHLA, 1966
S. cylindro- spora	Boden	U.S.A.	JENSEN, 1912; zit. BARRON 1961
		Jawa, Costa Rica	GILMAN, 1957; zit. BARRON 1961
		Japan	ICHINOE, 1970

Fortsetzung Tabelle 7:

Art	Substrat	Land	Referenzen
<i>S.sacchari</i>	Zuckerrohrwurzeln	Jamaica	ROBISON, 1970
<i>S.aurantia</i>	Boden	Kanada	BARRON, 1962
<i>S.bisbyi</i>	Boden	Kanada, Indien	BAKER, 1968
<i>S.lobulata</i>	Papier	Rumänien	McQUADE, 1963 SAYULESCU, 1971
<i>S.dichroa</i>	tot. Pflanzen	England	zit. BISBY und ELLIS, 1968
<i>S.parvispora</i>	n.a.	Afrika	zit. BARRON, 1962
<i>S.kampalensis</i>	n.a.	Afrika	
<i>S.theobromae</i>	n.a.	Afrika	
<i>S.nephrospora</i>	n.a.	Afrika	
<i>S.bambusicola</i>	Bambus	Java	RIFAI, 1964
<i>S.oenanthae</i>	tot. Pflanze	England	zit. BISBY und ELLIS, 1968

n.a. = nicht angegeben

2.4 Stachybotryotoxikose

Stachybotryotoxikose ist eine, durch die Aufnahme von Futtermitteln oder Einstreu, die mit einem toxinbildenden Stachybotrys-Stamm kontaminiert sind, bei Haustieren auftretende Mykotoxikose. Jedoch nicht nur Haustiere können an Stachybotryotoxikose erkranken, sondern auch der Mensch. Bei ihm wurden Krankheiterscheinungen beobachtet, sobald er mit Stachybotrys kontaminiertem Material oder daraus hergestellten Extrakten in Berührung gekommen war. Außerdem konnte bei direktem Kontakt eine mehr oder weniger schwere Dermatitis auftreten. Bei gleichzeitiger Inhalation von toxinhaltigem Staub trat Dyskrasie auf, die mit den Blutveränderungen der Stachybotryotoxikose der 2. Phase beim Pferd vergleichbar ist (DROBOTKO, 1945; DROBOTKO et.al., 1946; zit. JOSEPH FORGACS, 1962).

2.4.1 Geschichtlicher Überblick

Schon im Jahre 1929 berichtete der Budapester Tierarzt JARMAI in der Deutschen Tierärztlichen Wochenzeitschrift über eine tödliche Pferdekrankheit, die er irrtümlich als lethale Pyoseptikämie beschrieb, da er aus der Milz der verstorbenen Tiere das Bacterium pyosepticum viscosum isolieren konnte. Da das Bakterium sich als fakultativ pathogen erwiesen hatte, vermutete JARMAI einen unbekannten prädisponierenden Faktor, auf den er auch die seiner Zeit unerklärlichen Mundläsionen zurückführte. Erst 1954 konnte durch den russischen Wissenschaftler SARKISOW (zit. PALYUSIK, 1982) die näheren Zusammenhänge aufgeklärt werden. Die Diagnose Stachybotryotoxikose wurde erstmals 1931 in der Sowjetunion beim Auftreten einer Pferdeseuche, während deren Verlauf mehrere tausend Pferde erkrankten, und einige hundert Tiere verendeten, gestellt (zit. FORGACS, 1962).

Nicht nur die Krankheiterscheinungen zu erforschen, sondern auch die Ätiologie zu klären, gewann immer mehr an Bedeutung. Die Krankheit war weder infektiös, noch kontagiös. Auffällig war, daß gesunde Pferde, die mit erkrankten aufgestellt waren, aber mit einem anderen Futtermittel versorgt worden waren, nicht erkrankten. Erst ein Fütterungsversuch mit von einer schwarzen, weichen

Schicht umhüllten Stroh, das aus einem Betrieb stammte, in dem die Krankheit enzootisch war, brachte Klarheit über die Ätiologie dieser "mysteriösen" Krankheit. Nach dreiwöchiger Verabreichung zeigten die Pferde typische klinische Erscheinungen mit späterem lethalem Ausgang und charakteristischem pathologischen Befund. Bei der mykologischen Untersuchung wurde *Stachybotrys alternans* isoliert (zit. FORGACS und CARLL, 1962).

2.4.2 *Stachybotryotoxikose* des Menschen

Nach GAJDUSEK (1953) (zit. HINTIKKA, 1977) wurde eine Intoxikation des Menschen durch *Stachybotrys*-Toxine hauptsächlich in den Gebieten beobachtet, in denen die Krankheit bei Pferden auftrat. Erkrankte Menschen hatten bei der Fütterung der Tiere Kontakt gehabt mit dem *S. atra* kontaminiertem Heu bzw. Stroh oder Stroh als Bettzeug oder zum Heizen der Häuser verwendet (vgl. Tabelle 8).

Aus einer Beschreibung der *Stachybotryotoxikose* bei jungen Rindern durch OZEGOVIĆ et.al. (1971) geht hervor, daß Arbeiter, die *S. atra* kontaminiertes Stroh anfaßten, in 2-3 Tagen erkrankten. Die Krankheit wurde nach Ansicht der Autoren durch toxinhaltige Sporen verursacht. Die mittlere Krankheitsdauer betrug drei Wochen (vgl. Tabelle 8).

Nach DROBOTKO, wie GAJDUSEK (1953) berichtete (zit. HINTIKKA, 1977), tritt *Stachybotryotoxikose* bei Menschen nicht nur als Dermatitis, sondern gelegentlich auch als eine **allgemeine** Toxikose auf, entweder durch Absorption der toxischen Substanzen durch die Haut oder durch Inhalation von verschimmeltem Staub.

SZABO et.al. (1970) (zit. HINTIKKA, 1977) erwähnen in ihrer Veröffentlichung über *Stachybotryotoxikose* bei Schweinen die Erkrankung von sechs Menschen, die mit dem Stroh in Berührung gekommen waren (vgl. Tabelle 8). DZHILAVYAN (1963) (zit. HINTIKKA, 1977) beschreibt außer den Symptomen Dermatitis, katarrhalische Angina, Rhinitis, Konjunktivitis auch toxische Läsionen im Gesichtsbereich, an den Axillen, Kniebeugen und Perineum. Frauen zeigten zuweilen auch Affektionen im Brustbereich. Neben Husten, Rhinitis und Nasenbluten trat auch leichtes Fieber, Kopfschmerzen, allgemeine Schwäche und Erschöpfung auf (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 8: Klinisches Erscheinungsbild der
Stachybotryotoxikose des Menschen

Formen Phasen	Klinik	Leitsymp- tome	Referenzen
	Brennen in Mund und Nase Husten, Rhinitis Hautreizung an der direkten Kontaktstelle		SARKISOV et.al., 1972
1. Phase 2. Phase 3. Phase	an stark schwitzenden Stellen wie Achselgruben: Hautausschlag nässende Dermatitis trockene Krusten aus serösem Exudat katarrhalische Angina, schmerzhafte, heftige Pharyngitis und Brennen in der Nase Nasensexudat: evtl. blutig Fieber: nur in einzelnen Fällen Husten: mäßig bis heftig Leukopenie, bei manchen Patienten	Hautaffek- tionen	zit. HINTIKKA 1977
	Nase: angeschwollen einige Patienten: Nasenbluten ein Patient: Konjunktivitis		
	Dermatitis, toxische Läsionen am Gesicht, Axil- len, Kniebeugen, Perineum, Busen katarrhalische Angina, Rhinitis, Konjunktivitis leichter Fieber, Kopfschmerzen, allgemeine Kräftlosigkeit und Erschöpfung	Hautaffek- tionen	
dermale Form	Haut speziell auf dem Scrotum und später um den Anus und an der medialen Fläche der Ober- schenkel: starker Juckreiz und Rötung → hir- sekorngröße mit Eiter gefüllte Bläschen (inner- halb von 3 Tagen) Rhinitis, Pharyngitis, Konjunktivitis	Hautaffek- tionen	OZEGOVIC et.al 1971
	Dyspnö, Halsweh, kratzendes Gefühl im Hals, Na- senbluten od. blutige Nasensekretion, Krusten brennendes Gefühl in den Augen, Augenlider geschwollen Haut: Gesicht, Nase, Augen, Mund → hyperämie Haut: Schenkelbeugen, Hodensack, Gesäßspalte → nässende Hautentzündung Schwächegefühl, Ermüdbarkeit, Schweißaus- brüche	Atemweg- symptome Hautaffek- tionen	ANDRASSY et.al 1980

Fortsetzung Tabelle 8:

Formen Phasen	Klinik	Leitsymp- tome	Referenzen
chronische Form	Erkältungssymptome, Halsweh, Diarrhoe, Kopfschmerzen, Erschöpfung Dermatitis, intermittierende lokale Alopecie allgemeine Übelkeit ein Patient. Fußschmerzen	Erkältungs- symptome Hautaffek- tionen	CROFT et.al. 1986

ANDRASSY et.al. (1980) berichten über eine Erkrankung von 23 Personen, die mit der Lieferung und dem Aufladen von verschimmeltem Stroh beschäftigt waren (vgl. Tabelle 8). Gemäß den Autoren wurde diese Krankheit teils durch Einatmung der Sporen von *S. atra*, teils durch unmittelbaren Kontakt der Haut und der Schleimhaut mit dem Pilz verursacht. Als Folge des Fernbleibens der Erkrankten von der Arbeit und einer durchgeführten anti-phlogistischen Behandlung verschwanden die beobachteten Symptome im allgemeinen innerhalb einer Woche, lediglich bei einem älteren Asthmatiker waren sie, aufgrund der Verschlimmerung seines Zustandes, erst in 2 Wochen abgeklungen.

Bei fünf Kranken wurden Proben von der Haut des Gesichtes und vom Hodensack, sowie Abstriche von Nasen- und Halssekretion genommen. In je einem Fall konnte aus Nasensekret und aus Hautgeschabsel des Hodensackes *S. atra* gezüchtet werden.

Die Halme des Strohs waren deutlich sichtbar schwarz verfärbt. Auf Sabouraud-Agar und auf Actidion-haltigem Agar wurde in großer Zahl Kolonien von *Stachybotrys atra* gezüchtet; daneben kamen gelegentlich noch andere Pilze wie *Trichothecium roseum*, *Alternaria*, *Penicillium* und *Hormodendrum* zur Entwicklung.

CROFT et.al. (1986) berichten über einen Haushalt in Chicago, in dem alle Bewohner unter chronischen Krankheitserscheinungen litten, die in Tabelle 8 erläutert werden. Bei einer Untersuchung der Luft, bei der 6000 Liter durch einen Apparat gepumpt wurden, der die Luftpartikel direkt als wäßrige Lösung überführte, wurden *Stachybotrys*-Sporen und *Trichothecene* nachgewiesen. Auch von der Zimmerdecke und aus Staub des Lüftungskanals konnten *Stachybotrys atra*-Sporen isoliert werden. Von dem letzteren Probenmaterial wurden in Ethanol gelöste Extrakte an 5 Ratten und Mäusen per os verabreicht. Nach 24 Stunden waren alle Versuchstiere, die 3 Grammäquivalent der Zimmerdeckenprobe oder 1,4 Grammäquivalent Lüftungskanalstaub erhalten hatten, verendet. Histologische

Untersuchungen von Organmaterial der Versuchstiere ergaben Hämorrhagien, Nekrosen und Degenerationen im Gehirn, Thymus, in der Milz, im Magen-Darmtrakt, in der Lunge, im Herz, in Lymphknoten, in der Leber und den Nieren.

Aus Probenmaterial der Zimmerdecke konnten die Autoren den direkten Nachweis der Toxine Verrucarol, Verrucaridin B und J, Satratoxin H und Trichoverroide A und B führen (vgl. Kapitel 2.5).

Die Autoren waren der Meinung, daß die Toxine hauptsächlich in den Stachybotrys-Sporen zu finden sind, so daß die Aufnahme der Toxine durch Inhalation über längere Zeit zum Ausbruch der Krankheit führen kann.

2.4.3 Stachybotryotoxikose der Tiere

2.4.3.1 Pferd

Die Stachybotryotoxikose kann beim Pferd in Abhängigkeit der Toxinkonzentration im Futter in einer **typischen** oder **atypischen** Form auftreten. Bei der atypischen Form sterben die Tiere ganz plötzlich, während die Krankheit in der typischen Form allmählich in drei voneinander unterscheidbaren Phasen abläuft (zit. HINTIKKA, 1977; vgl. Tabelle 9).

Hinweisend auf das Vorliegen der **atypische Form**, die man auch perakute Form nennen könnte, ist das Auftreten nervöser Störungen. Der Tod tritt normalerweise nach 1-3 Tagen durch respiratorische Insuffizienz ein (zit. HINTIKKA, 1977; zit. FORGACS, 1962). (vgl. Tabelle 9)

Die **erste Phase** der **typische Form** der Stachybotryotoxikose beim Pferd beginnt mit einer Reaktion an Mund und Augen, den Partien des Körpers die als erste mit dem toxinhaltigen Futter in Berührung kommen (HINTIKKA, 1977). Diese erste Phase dauert i.d.R. 2-3 Tage an, kann sich aber bis zu einem Monat hinziehen, wobei sie oftmals unbemerkt bleibt (zit. HINTIKKA, 1977).

Tabelle 9: Klinisches Erscheinungsbild der Stachybotryotoxikose des Pferdes *

Formen	Klinik	Leitsymptome	Referenzen
A. typische Form	orale Schleimhaut: trocken → hyperämisch → odematos → nekrotisch	Reaktion von Mund u. Augen	zit HINTIKKA 1977
1. Phase	Lippen und Mundwinkel: Fissuren, Nekrosen zäher Speichelfluß katarthalische, nasale Exudation subkutanes Gewebe, insbes. am Unterkiefer → odematos → Nilpferdkopf Kopflymphknoten: schwellen an, sind beim Palpieren schmerzhaft Konjunktiven: hyperämisch, Tränenfluß → Konjunktivitis Augenlider: angeschwollen	2-3 Tage (1 Monat)	
2. Phase	Zunge und Tonsillen: Nekrose mögl. → Futteraufnahme erschwert Leukozytose → Leukopenie (1000 bis 2000/mm ³) rel. Lymphozytenzahl ↑ Thrombozytenzahl ↓ ↓ Blutgerinnungszeit ↑ → keine Koagulation	Blutbildveränderungen 15-20 (50) Tage	
3. Phase	Temperatur: 40-41,5°C Leuko- und Thrombozytopenie ↑ Blutgerinnung versagt Appetit vermindert od. absolut gedrosselt, Schlucken erschwert, Verdauung gestört Peristaltik erhöht od. erniedrigt, Kolikgefahr Harn: evtl. Proteine, zylindrische und epitheliale Zellen (toxischer Effekt in der Niere) Puls: schwach, arrhythmisch 60-100/Minute) Die Tiere sind schwach, liegen oft und verlieren an Gewicht Septikämie → Tod	sekundäre bakterielle Komplikationen → Septikämie 1-6 Tage	
B. atypische od. perakute Form	Verminderte Reflexe, Hyperästhesie, Hyperirritabilität, Verblindung, totale Verblödung Tiere vermeiden Bewegung, stehen mit gespreizten Beinen bzw. gekreuzten Vorderbeinen, lehnen sich an Gegenstände, wenn zum gehen gebracht. Bewegungen unsicher Anorexie, Wasser wird gierig aber mit großen Schluckschwierigkeiten getrunken Temperatur: 40-41°C Puls: schwach, arrhythmisch (80-100/Minute) Agonie → Inkoordination, periodisch klonische Spasmen, Tremor schwere Fälle: erhöhte Peristaltik und Diarrhö Lungenödem (Schleimhäute zyanotisch) respiratorische Insuffizienz → Tod	nervöse Störungen 1-3 Tage	

* isolierte Bakterien: Actinobacillus equuli
(Sekundärinfektion)

Tabelle 10: Pathologisch-anatomische Veränderungen bei
Stachybotryotoxikose des Pferdes (zit. HINTIKKA, 1977)

Hämorrhagien	Nekrosen	Degeneration	Ödem	Sonstiges
seröse und muköse Membranen	Verdauungstrakt (keine Demarkationszone)	Leber	Lunge	Knochenmark
Skelettmuskeln	orale Schleimhaut	Niere	subkutanes Gewebe	gallertartig
Milz	weicher Gaumen	Myokard	(oft blutfar- ben)	
Lymphknoten	Tonsillen			
Leber	Lippen			
Lunge	(runde od. ovale, klar um- schriebene, gelblich-braun graue, nekrotische Bläs- chen)			
Gehirn				
Rückenmark				
Dünn- und Dickdarm				

Bei fortgesetzter Aufnahme des toxinhaltigen Futters erfolgt ein Übergang der Krankheit in die **2. Phase**, für die Veränderungen des Blutbildes und Symptome einer generalisierten Toxikose charakteristisch sind (zit. HINTIKKA, 1977). (vgl. Tabelle 9)

Die zweite Phase währt 15-20 Tage, kann aber auch bis zu 50 Tagen fortbestehen (zit. HINTIKKA, 1977).

In der **dritten Phase** kommt es zur Manifestation bakterieller Sekundärinfektionen mit septikämischem Ausgang. Die Septikämie wird zum überwiegenden Teil der Fälle von *Actinobacillus equuli* (= *B. pyosepticum viscosum* = *Shigella equiralis*) verursacht, und ist durch therapeutische Maßnahmen (z.B. Verabreichung von Antibiotika) nicht beherrschbar (zit. HINTIKKA, 1977; zit. PALYUSIK, 1982).

Die dritte Phase dauert oft nur 1-6 Tage, und endet tödlich. Trächtige Stuten abortierten normalerweise kurz vor dem Tod (FORGACS und CARLL, 1962). Bei der Behandlung der Krankheit kann es dadurch zu Mißerfolgen kommen, daß nur die Pyoseptikämie behandelt wird, die Grundkrankheit aber unerkannt bleibt und somit das kontaminierte Futtermittel oder der Einstreu nicht entfernt wird (PALYUSIK, 1982).

Differentialdiagnostisch sind in der ersten Phase der typischen Form Stomatitiden infektiöser Genese z.B. Stomatitis vesicularis und die seltenere Form von Pferdepocken auszuschließen. Die dritte Phase erinnert klinisch, wegen der Septikämie, an z.B. Salmonellose, Listeriose oder Milzbrand. Differentialdiagnostisch

können neben der atypischen Form klinisch folgende Krankheiten mit zentralnervöser Symptomatik in Betracht bezogen werden : Bornasche Krankheit, außereuropäische Pferdeenzephalomyelitiden, Tollwut und Leptospirose (Dietz und Wiesner, 1982).

Als typische pathologisch-anatomische Veränderungen des Pferdes sind Hämorrhagien auf den serösen und mukösen Membranen, in den parenchymatösen Organen und Rumpfmuskeln sowie Nekrosen entlang des gesamten Verdauungstraktes anzusehen (vgl. Tabelle 10). Die großen Hämorrhagien in den Muskeln sind denen, die durch Quetschungen entstehen, ähnlich.

2.4.3.2 Rind

Wiederkäuer reagieren nach SPESIVTSEVA (1964), NOSKOV und OGRYSKOV (1967) und DANKO (1972) (zit. HINTIKKA, 1977) wegen ihres andersartigen Verdauungssystems weniger empfindlich gegenüber den Stachybotryotoxinen. Da Stachybotryotoxine hauptsächlich im sauren Milieu wirksam sind, ist der Wiederkäuer sowohl durch seinen alkalischen, in großen Mengen produzierten Speichel, als auch durch seinen neutralen, bis leicht alkalischen Rumeninhalt geschützt (zit. HINTIKKA, 1977). Saure Futtermittel, z.B. Silofutter begünstigen dagegen die Manifestation einer Stachybotryotoxikose beim Rind, da das mild säuerliche Milieu die Resorption der Toxine fördert (PALYUSIK, 1982).

Das klinische Erscheinungsbild der Intoxikation des Rindes ist, wie beim Pferd, von der aufgenommenen Toxinmenge abhängig. Beim Rind sind eine **akute**, eine **chronische** und eine **dermale** Verlaufsform beschrieben (zit. HINTIKKA, 1977). Eine Übersicht über die klinischen Symptome gibt die Tabelle 11 wieder. Im Unterschied zum Pferd kommt es bei der chronischen Vergiftung des Rindes nicht zu drei voneinander unterscheidbaren Phasen.[†]

Die akute Toxikose kann auch einen **verlängerten Verlauf** nehmen, wobei sich einige Symptome, die charakteristisch für die chronische Toxikose sind, entwickeln können (HINTIKKA, 1977).

Nach SPESIVTSEVA (1964) (zit. HINTIKKA, 1977) abortieren die Kühe normalerweise in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit, wobei petechiale Blutungen in der Haut, den inneren Organen des Fötus und den Eihäuten zu beobachten sind.

OZEGOVIC und Mitarbeiter (1971) (zit. HINTIKKA) berichteten über eine seltsame Hautreaktion einer Herde, bei der verschimmelter Stroh als Einstreu benutzt worden war (vgl. Tabelle 11).

Differentialdiagnostisch sind MKS, Stomatitis vesicularis, Stomatitis papulosa, BKF, sowie lokale Defekte infolge Verätzungen oder traumatischen Einwirkungen von der Stachybotryotoxikose abzugrenzen. Auch Aktinobazillose der Zunge, Virusdiarrhoe (Mucosal disease) und Kuhpocken können im Anfangsstadium gelegentlich Anlaß zur Verwechslung mit Stachybotryotoxikose geben (Rosenberger et. al., 1978).

Die typischen pathologisch-anatomischen Befunde beim Rind sind hämorrhagischen Diathese, Nekrosen, Entzündungen und Ödeme (vgl. Tabelle 12).

Die nekrotischen Herde sind von unterschiedlicher Größe und Form und können entweder von einer roten Zone umgeben oder diffus ausgebildet sein. Charakteristisch sind die, von einem Ödem umgebenen tiefen Nekrosen des Magen- Darmtraktes und der Muskeln (zit. HINTIKKA, 1977).

Tabelle 12: Pathologisch-anatomische Veränderungen bei Stachybotryotoxikose des Rindes (zit. HINTIKKA, 1977)

Hämorrhagien	Nekrosen	Degeneration	Ödem	Sonstiges
seröse u. muköse Membranen	Lippen	Gehirn	Submukosa	Knochenmark
Thorax	Mund	(dystrophische Degeneration)	unter den Muskeln	blutiger, Hypoplasie der Myeloblasten,
Abdomen	Tonsillen			Lungenemphysem - hepatisierung mögl.
Endokard	Rumen			evtl. Niereninfarkte
unter Perikard	Reticulum			
Lymphknoten	Omasum			
Milz	Abomasum			
Skelettmuskeln	Darm			
Hals, Brust,	Leber			
Schultern	Lunge			
	Pleura costalis			

2.4.3.3 Schaf

FORGACS (1962), STANKOUSHEV et.al. (1965), DZHILAVYAN (1970), PAVLOV et.al. (1970), SZABO et.al. (1970), SARKISOV et.al. (1971), und NIKOV et.al. (1974) (zit. HINTIKKA, 1977) berichten über die Stachybotryotoxikose bei Schafen. Es handelt sich dabei sowohl um Fallberichte als auch Beschreibungen von experimentell erzeugten Toxikosen. Die Symptome, die bei Fütterungsversuchen zu beobachten waren, entsprachen denen anderer Haussäugetiere (vor allem Rind; vgl. Tabelle 11 und Tabelle 13).

PAVLOV et.al. (1970) verfütterten mit toxischen Stachybotrys-Stämmen kontaminiertes Stroh und Hafer an Schafe. Solange die Verfütterung gemeinsam mit Wiesenheu und Rüben erfolgte, kam es nicht zu Erkrankung der Tiere; sobald dagegen den Tieren Silage vorgelegt wurde, kam es zum Ausbruch der für die Stachybotryotoxikose typischen Symptome. Bei Zusatz von Alkalien trat keine Erkrankung auf. HAJTOS et. al. (1983) berichten über eine Erkrankung einer ganzen Schafherde, bei der 41 von 970 der 6-7 Monate alten Tiere verendeten. Sowohl Einstreu als auch das verfütterte Weizenstroh war stark mit Stachybotrys atra kontaminiert. Es wurde durch die dünnschichtchromatographische Untersuchung von Extrakten des Stachybotrys-Stammes festgestellt, daß dieser Satratoxin G und H bildete.

Bei der bakteriologischen Untersuchung der Milz und der Leber verendeter Schafe konnte bei vier von fünf Tieren Pasteurella haemolytica (Biotyp - T, Serotyp - 3) nachgewiesen werden.

Da bei Schafen sowohl die klinischen Symptome, als auch die pathologisch-anatomischen Veränderungen einer Stachybotryotoxikose weitgehend mit dem Krankheitsbild, verursacht durch Pasteurella haemolytica (Biotyp - T), übereinstimmt, nahmen HAJTOS et.al. an, daß Stachybotryotoxikose lediglich als prädisponierender Faktor die Manifestation der ovinen Pasteurellose begünstigte.

HARRACH et.al. (1983) berichten über einen fatalen Ausbruch von Stachybotryotoxikose einer Schafherde, wobei 100 Tiere verendeten.

Sie konnten in dem verwendeten, mit Stachybotrys atra befallenen Einstreu Satratoxin G und H direkt nachweisen (vgl. Kapitel 2.5). Auch in diesem Fall war Pasteurella haemolytica aus Organen (Milz und Lunge) einiger Tiere züchtbar.

Tabelle 13: Klinisches Erscheinungsbild der Stachy-
botryotoxikose des Schafes *

Formen		Leitsymp- tome	Referenzen
A. hämorrhagi- sche Form	a) Tod ohne klinischen Symptome b) Allgemeinbefinden ↓ Temperatur: 41-42 °C Dyspno, Trägheit, Anorexie intermittierender, hämorrhagischer Diarrhö Nasenbluten (60% der Tiere) vereinzelt Rötung von Ohrspitzen anfällig gleich wie A. b)	Durchfall	SCHNEIDER et.al. 1979
B. anämische Form	Anämie ↑ Lämmer: lethargisch → fieberhaft → Teil- nahmslosigkeit ↑ Tot ohne Nahrungsaufnahme innerhalb von 12-24 Std	Anämie	
	verminderter Appetit Mundödem, Speichelfluß, superfizielle od. tiefe Erosionen der Lippen Milchsekretion ↓ Temperatur ↑ Reflexe ↓ Hypotonie od. Atonie der Vormägen → Diarrhoe Anämie, Hämoglobin ↓ (12%), Erythrozyten ↓ (1000 000/nm ³), Leukopenie, Thrombozytopenie, relative Lymphozytose, Blutgerinnungszeit ↓	Durchfall Anämie	zit. HINTIKKA 1977
	Vliesverlust zusätzlich zu den oben beschriebenen Symptomen		HARRACH et.al. 1983

* isolierte Bakterien: Pasteurella haemolytica, Clostridium cepticum und perfringens, Echerichia coli, Klebsiella und Staphylococcus spp. (Sekundärinfektion)

Eine ausführliche Beschreibung des Auftretens einer vermutlichen Stachybotryotoxikose bei Schafen liegt von SCHNEIDER und Mitarbeitern (1979) aus Südafrika vor. Es handelt sich dabei um einen Bericht über eine 568-köpfige Merinoschafherde, von der 109 Schafe nach Auffassung der Autoren an der Krankheit starben.

SCHNEIDER et.al. unterschieden zwischen a) **hämorrhagisch-septikämischen Fällen** und b) **anämischen Fällen**. Die adulten Schafe starben entweder ohne vorherige klinische Anzeichen, oder zeigten zunächst Störungen im Allgemeinbefinden (vgl. Tabelle 13).

Die **anämischen Fälle** ähnelten anfänglich dem Erscheinungsbild der hämorrhagisch-septikämischen Fälle bis die Anämie immer stärker und zum Leitsymptom der Erkrankung wurde. Böcke waren allgemein weniger betroffen als Mutterschafe, jedoch starben alle Tiere, die klinische Veränderungen gezeigt hatten, trotz intensiver antibiotischer Behandlung. Nur Tiere, die extrem anämisch waren und deswegen eine Bluttransfusion zusätzlich zur Antibiotikatherapie erhalten hatten, überlebten (15 von 17).

180 von 400 Lämmern starben, ohne Nahrung aufzunehmen, innerhalb von 12-24 Stunden. Die Sterblichkeit der Mutterschafe fing zu dem Zeitpunkt an, als die Mortalität der Lämmer ihren Höhepunkt erreicht hatte.

Da Schneider et.al. bedauerlicherweise keine mykologische Untersuchungen durchgeführt haben, ist es nicht eindeutig bewiesen, daß es sich bei der Erkrankung um Stachybotryotoxikose gehandelt hat.

Als typisch für die Krankheit sind bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung hämorrhagische Diathesen in der Subkutis und Muskulatur des Halses und der Schultern anzusehen (HINTIKKA, 1977). (vgl. Tabelle 14)

Tabelle 14: Pathologisch-anatomische Veränderungen bei der Stachybotryotoxikose des Schafes (zit. HINTIKKA, 1977)

Hämorrhagien	Nekrosen	Sonstiges
Subkutis	Abomasum	Lippen u. Mund-
Nacken- u. Schulter-	Rumen (gelegentl.)	schleimhaut: Erosio-
muskulatur	Dickdarm (gelegentl.)	nen, Schorfbildung
innere Organe		

2.4.3.4 Schwein

Beim **Schwein** tritt die Stachybotryotoxikose in einer **dermalen Form** und einer **allgemeinen Form** auf. Letztere kann in eine **akute** oder atypische, eine **verlängerte**, der typischen Form ähnelnde, und eine **chronische** Toxikose unterteilt werden (HINTIKKA, 1977). Für die **dermale Form** sind bei Muttersauen Gesäugeverletzungen, hervorgerufen durch saugende Ferkel von Bedeutung. Dadurch ist es möglich, daß Pilzsporen des kontaminierten Einstreus leichter in die Haut eindringen. Die entzündete Haut ist gerötet und wird bald bräunlich bis grau-braun mit rissigen Krusten (HINTIKKA, 1977). (vgl. Tabelle 15)

Die **allgemeine Form** kann beim Schwein durch toxisches Einstreu oder Futter hervorgerufen werden. Bei der **verlängerten Verlaufsform** kann es durch Resistenzverminderung zu Sekundärinfektionen, z.B. mit Streptokokken kommen (HINTIKKA, 1977).

VACHEV et.al. (1970) berichten über einen Zuchtsauenbetrieb in dem 30 Sauen plötzlich zwischen dem 60. und 90. Tag der Trächtigkeit abortierten. Die Früchte waren mazeriert, mumifiziert oder normal. Das in diesem Betrieb verwendete Stroh war stark mit Stachybotrys befallen. Bei den Muttersauen kam es zu Symptomen, wie sie in Tabelle 15 beschrieben sind.

PALYUSIK und RIFAI (1973) berichten, daß kleine Mengen Stachybotrys-crude-Toxin, über längere Zeit verabreicht (Fütterungsversuch), bei Läufer Schweinen Anämie verursachten. Die Anämie trat trotz vorheriger Verabreichung eines Eisenpräparates auf, so daß unter Feldbedingungen mit dieser Form der Stachybotryotoxikose bei Läufer Schweinen auch dann gerechnet werden muß, wenn die übliche Prophylaxe gegen Anämie durchgeführt wurde.

Differenzialdiagnostisch ist die Stachybotryotoxikose bei Vorliegen von Hautveränderungen klinisch gegen MKS und Bläschenkrankheit (SVD) abzugrenzen. Bei der abortiven Form ist ein Verwerfen durch Viren, Bakterien, andere Pilze (Fusarien, Aspergillen, Penicillien) sowie durch Pestizide auszuschließen (SCHULZE et.al. 1980).

Das pathologisch anatomische Bild der akuten Toxikose ist bestimmt durch das Auftreten von Hämorrhagien in der Haut und den Schleimhäuten.

Tabelle 15: Klinisches Erscheinungsbild der Stachybotryotoxikose des Schweines *

Formen	Klinik	Leitsymptome	Referenzen
A. dermale Form	Rüsselscheibe, Mundwinkel: Schwellung, Hyperämie → grau-gelbe od. grau-braune Lage evtl. Krusten um den Mund, -winkeln und der Spitze des Kiefers Nase: farbloser, seröser Exudat → grau, katarrhalisch, Nasenlöcher mit Schmutz und verschorftem Material aus der Epidermis zusammengeklebt → Erosionen Augenlider, Wimpern: Exudation, Krustenbildung Zunge: manchmal grau-gelbe Beläge oder Punkte Bauch, Zitzen, Nabel: braune Krusten	Hautaffektionen	zit. HINTIKKA 1977
B. allgemeine Form			
1) hochakute = atypische Form	sich übergeben, Speichelfluß, starke Depression Tachykardie, Tremor, Paralyse von Hintergliedmaßen Leukozytose		
2) verlängerte = typische Form	verminderter Appetit, Depression Thrombo- u. Leukopenie, Blutgerinnungszeit ↑ Lippen schwellen an u. nekrotische Prozesse verbreiten sich auf der Backenschleimhaut und der Zunge Haut um den Fersen und Unterschenkeln oft verschorft, manchmal nekrotisch sehr dünnbehaarte Stellen des Körpers (Haut hinter den Ohren, auf dem Bauch und um den Anus herum): hämorrhagisch od. gelegentl. mit kleinen Wunden versehen Zitzen oft in Mitleidenschaft gezogen	Hautaffektionen	
3) chronische Form	Hyperämie der Mundschleimhaut, kleine, einzelne Hautläsionen insbes. an den Lippen Leukozytose insbes. Neutrophilie hypochromische Erythropenie → Anämie Eosinophilie alkalische Phosphatase ↓ Plasmaproteinspiegel ↓ unkoordinierter Bewegungsablauf möglich gegen Ende: Temperatur ↑ Herzfrequenz ↑ Leukopenie mit relativer Lymphozytose	Blutbildveränderungen	

Fortsetzung Tabelle 15:

Formen	Klinik	Leitsymptome	Referenzen
4. abortive Form	Muttersäug: verminderter Appetit, Zittern Hypersensibilität → totale Futterverweigerung, lila bis rote Flecken auf der Haut → dunkel lila, Epidermis, squamös Hämorrhagien auf der Haut (Abdomen, Gesäuge, Flanken) → Nekrose evtl. Tod Früchte: mazeriert, mumifiziert od normal	Hautaffektionen nach 2-3 Tagen Aborte	VACHEY 1970

* isolierte Bakterien: Streptokokken
(Sekundärinfektion)

Für die chronische Form sind zusätzlich Hämorrhagien in verschiedenen Organen charakteristisch (vgl. Tabelle 16).

Tabelle 16: Pathologisch-anatomische Veränderungen bei Stachybotryotoxikose des Schweines (zit. HINTIKKA, 1977)

Hämorrhagien	Nekrosen	Sonstiges
Diaphragma unter Pleura costalis	Magen Darm	Leberdystrophie Rüsselscheibe schuppig
Lungen unter Endo- u. Epikard		
unter Peritoneum		
Lymphknoten		
Verdauungstrakt		

2.4.3.5 Fleischfresser

Fallberichte über das Vorkommen von Stachybotryotoxikose beim **Fleischfresser** liegen bislang nicht vor. Das kann darauf zurückzuführen sein, daß ein Kontakt zu Materialien, die mit Stachybotrys atra kontaminiert sein können, kaum besteht.

KORNEEV (1948) (zit. FORCACS und CARLL, 1962) versuchte experimentell eine Stachybotryotoxikose beim Hund zu erzeugen. Ein Milliliter eines Rohtoxinextraktes führte nach einmaliger oraler Applikation in 1-3 Tagen zu einer akuten Toxikose, die am 4. bzw. 6. Tag zum Tod der Tiere führte. Eine geringere Menge crude Toxins (0,25ml) täglich verabreicht, bewirkte eine Leukozytose innerhalb von 10-20 Tagen. Leukopenie und Thrombozytopenie traten am 45. Tag auf, die Körpertemperatur stieg rasch an und auf Paralyse folgte der Tod.

2.4.3.6 Geflügel

Eine Empfänglichkeit für Stachybotryotoxine besteht auch beim **Geflügel**. Die ersten Ausbrüche einer Stachybotryotoxikose wurden von SARKISOV (1940-1946) und ASKALONOV (1949) (zit. PALYUSIK, 1970) beschrieben. SCHUMAIER et.al. (1963), PALYUSIK (1970), PALYUSIK et.al. (1970) und NAGY et.al. (1970) führten Experimente zum Studium der Stachybotryotoxikose beim Huhn durch. PALYUSIK et.al. (1968) berichten über einen Fall von Stachybotryotoxikose bei jungen **Gänsen**. Es kam dabei zu den typischen Läsionen auf der Schnabelschleimhaut, speziell am Zungengrund. Zwölf von 28 Gänsen starben im Alter von 2 Wochen (vgl. Tabelle 17).

Beim **Huhn** wurde sowohl eine akute, als auch eine chronische Verlaufsform beobachtet (HINTIKKA, 1977). Symptome, die bei der **akuten Form** auftreten sind in Tabelle 17 beschrieben.

Bei der **chronischen Verlaufsform** kommt es zu Schleimhaut- und Blutveränderungen (vgl. Tabelle 17). Hierbei sind die oralen Läsionen schwächer ausgeprägt und das Allgemeinbefinden ist weniger gestört. Die Körpertemperatur steigt bis zum Tod (27-47 Tage nach Krankheitsbeginn) nicht an.

Tabelle 17: Klinisches Erscheinungsbild der Stachyboltryuloxikose des Huhnes

Formen	Klinik	Leitsymptome	Referenzen
A. akute Form	Niedergeschlagenheit, Appetitlosigkeit, Schwäche Ataxie; Verlust von 20- 30% des Körpergewichtes in 1-2 Wochen		zit. HINTIKKA 1977
B. chronische Form	Schleimhaut der Zungenspitze: gelblich, trocken entlang der nasopalatinen Fissur, in den Ecken des weichen Gaumens und an der kranialen Larynxschleimhaut: kleine, gelbliche Vesikel → herdenförmig, evtl. diffuse Nekrosen → diphtheroide Beläge → Schnabel kann nicht geschlossen werden → Futteraufnahme erschwert; betroffene Areale können gangränös werden Niedergeschlagenheit, Motilität ↓, unsichere Haltung, hängen lassen der Köpfe Thrombozytopenie bis 5400-7300/mm ³ Leukozytopenie bis 4500-5800/mm ³ relative Lymphozytose, in extremen Fällen 84-86% Tod 27-47 Tage nach Krankheitsbeginn	Schleimhautveränderungen Blutbildveränderungen	

Tabelle 18: Pathologisch-anatomische Veränderungen bei Stachyboltryuloxikose des Huhnes (zit. HINTIKKA, 1977)

Hämorrhagien	Nekrosen	Degeneration
Haut, Subkutis, unter der Epidermis des Muskelmagens Drüsenmagen Duodenum subepikardial subpleural unter der Leberkapsel	Zunge Gaumen Gesicht Larynx cranialis Verdauungstrakt spez. Kropf Drüsenmagen Muskelmagen	Leber Nieren Myokard

Differenzialdiagnostisch ist vor allem an die diphteroide Form von Geflügelpocken zu denken, da die hierbei entstehenden Mundläsionen Ähnlichkeit mit den, bei der Stachybotryotoxikose auftretenden Veränderungen aufweist (PALYUSIK et.al., 1970). Auch andere, mit Schleimhautveränderungen einhergehende Erkrankungen, wie Soor infolge von Vitamin A - Mangel können zur Verwechslung Veranlassung geben (HILBRICH, 1967).

Als charakteristische pathologisch-anatomische Veränderungen der experimentellen Stachybotryotoxikose waren Entzündungen und Nekrosen der mukösen Membranen des Mundes und Kropfes anzusehen, wobei diese hauptsächlich im Mund auftraten (SCHUMAIER et.al. 1963). (vgl. Tabelle 18)

PALYUSIK (1970) fand ansonsten die gleichen Veränderungen wie SCHUMAIER et.al. (1963), jedoch keine Schleimhautveränderungen im Kropf.

2.4.3.7 Zootiere

Auch bei **Zootieren** kam es zu Ausbrüchen von Stachybotryotoxikose. STANKOUSHEV et.al. (1965) berichten aus Bulgarien über eine **Büffelherde**, in der 28 Tiere (26% der Herde) erkrankten, von

Tabelle 19: Klinisches Erscheinungsbild der Stachybotryotoxikose von Zootieren *

Tier	Klinik	Leitsymptome	Referenzen
Büffel	verminderter Appetit, Hyperämie und Erosionen der Mundschleimhaut, Speichelfluß ↑, nasaler Ausfluß Milchproduktion ↓, ruminale Atonie Temperatur ↑ (40 °C) Tremor, Krämpfe Erythrozyten ↓, markante Leukopenie mit Lymphozytose, verminderte oder fehlende Blutgerinnung	Blutbildveränderungen	STANKOUSHEV et.al. 1965
Eich	Diarrhoe → hämorrhagisch Schwäche, taumelnder Gang einer der schwer erkrankten Tiere konnte kaum ohne hinzufallen gehen, lehnte sich oft an Gegenstände und kreuzte die Vorderbeine	Diarrhoe nervöse Störungen	WAHLBERG et.al. 1973

* Büffel: Clostridium perfringens (Sekundärinfektion)

denen zwei starben und sechs getötet werden mußten. Klinische Symptome wurden 1-6 Tage nach Fütterung des kontaminierten Strohs beobachtet; sie hielten noch 3-8 Tage nach dessen Entfernen an (vgl. Tabelle 19). Eine Sekundärinfektion mit *Clostridium perfringens* wurde festgestellt.

WAHLBERG et.al. (1973) berichten über eine Krankheit bei **Elchen**, die sie als Stachybotryotoxikose diagnostizierten. Zwei von acht Elchen verendeten. Bei den Tieren fehlten die bei Wiederkäuern sonst zu beobachtenden Mundläsionen (vgl. Tabelle 19).

Weitere Fälle wurden von TKACHENKO (1960) bei einem **Bison** und einem **Nilpferd** und von LEBARS et. al. (1976) beim **Damhirsch** diagnostiziert.

2.4.3.8 Labortiere

Fütterungsversuche wurden von mehreren Autoren an **Labortieren**, wie weißen Mäusen, weißen Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen durchgeführt.

Bei oralem Belastungsversuch von KORNEEV (1948) starben die **Mäuse** innerhalb von 2-3 Tagen. Nach intravenöser oder subkutaner Injektion verendeten die Mäuse sofort oder innerhalb von 6-12 Stunden.

YUSKIV (1969), PLYUSIK (1970), FORGACS (1972) (zit. KÖRPINEN 1973) berichten über einen weniger akuten Verlauf bei weißen Mäusen (vgl. Tabelle 20).

KÖRPINEN (1974) berichtet über einen Fütterungsversuch an trächtige Mäuse, denen Dosen verabreicht worden waren, die beim Muttertier keine klinischen Symptome hervorriefen, die aber zu Fruchtresorbtionen, verkümmerten Föten, erhöhtem Absterben der Föten und einer verminderten Konseptionsrate bei den Muttermäusen führten.

Bei **Meerschweinchen**, die kontaminierten Hafer erhielten, kam es, abhängig von der Dosis, zu **akutem**, **subakutem** und **chronischem Verlauf** der Toxikose. In **akutem Fall** starben die Tiere in 3-5 Tagen. In den **chronischen Fällen** kam es in 25 - 40 Tagen zum Tod (vgl. Tabelle 20).

KORNEEV (1948; zit. FORGACS und CARLL, 1962)) fütterte **Kaninchen** mit Hafer, der mit *Stachybotrys atra* kontaminiert war. Nach anfänglicher Futterverweigerung nahmen die Tiere das Futter auf;

Tabelle 20: Klinisches Erscheinungsbild der Stachybotryotoxikose von Labortieren

Formen	Klinik	Leitsymptome	Referenzen
Maus			
1) akute Form	oral: 2. Versuchstag: Depression, struppiges Fell; nach 2 Tagen: paralytische Symptome, Atmungsschwierigkeiten, verminderte Sensorik → Tod i.v. od. s.c.: Tod sofort od. nach 6-12 Stunden		KORNEEV 1947
2) subakute Form	Lippen: starke Nekrosen Tatzen können auch betroffen sein (Krustenbildung)		zit. HINTIKKA 1977
Meerschweinchen			
1) akute Form	Nekrosen der Lippen in 2-8 Tagen orale Schleimhaut: puffig mit Nekrosen evtl. Leukozytose	Schleimhautaffektionen	
2) subakute Form	Lippen: hyperämisch, angeschwollen Fulleraufnahme erschwert Allgemeinbefinden: gut		
3) chronische Form	5-8 Tage nach Beginn der Mundläsionen: Leukopenie, Thrombopenie, Agranulozytose am letzten od. vorletzten Tag: Temperatur ↑ (41-42 °C) kurz vor dem Tod: Leukozytopenie (3000-5000/mm ³) Tod: 25-40 Tage nach Fütterungsbeginn	Blutbildveränderungen	
Kaninchen			
	einige Tage Futtermittelverweigerung		
1. Phase	Mundschleimhaut: kleine, eitrige Bezirke und Wunden (in 15-20 Tagen) Lippen: angeschwollen	Schleimhautaffektionen	
2. Phase	in 25-50 Tagen: Leukopenie (3000-4000/mm ³), Agranulozytose, später Thrombopenie	Blutbildveränderungen	
3. Phase	Leukopenie Temperatur ↑ → Tod		

Tabelle 21: LD₅₀ von einigen Mykotoxinen für Labortiere
und LD₅₀ eines Stachybotrys Rohloxins.
(zit. UENO, 1983; Bamberg, 1972; BODON
und PALYUSIK, 1970)

Toxin	Maus mg/kg				Ratte mg/kg				Ka
	i.p.	p.o.	i.v.	s.c.	i.p.	p.o.	i.v.	i.v.	
Roridin A	0,5		1,0						
Verrucarín A	0,5		1,5				0,87	0,54	
Verrucarín B			7,0						
Verrucarín J	0,5								
Satratoxin H	2,6	7,0				7,0			
Trichothecin	<250		300	250	<250				
Rohloxin 4,49-9,20 mg					35,9-17,5ug				
Ratte, Maus, Meerschweinchen, Küken (i.p.)					Hühnerembryo, je nach alter				

Tabelle 22: Werte, mit denen bei Versuchstieren eine
experimentelle Aleukie erzeugt werden
konnte (zit. UENO, 1983)

Verrucarín A	Tierart	Dosis i.v. mg/kg	Zeit (Wo)
	Ratte	0,25	4
	Hund	0,08-0,15	2-4
	Meerschweinchen	0,08-0,15	2-4
	Affe	0,08-0,15	2-4

es entwickelten sich innerhalb von 15-20 Tagen die typischen Läsionen an Lippen und Mundschleimhaut (vgl. Tabelle 20). Die Krankheit führte nach 35 - 60 Tagen zum Tode.

Angaben über LD_{50} bei Labortieren enthält die Tabelle 21. Tabelle 22 informiert über die Konzentrationen, die im Experiment zur Erzeugung einer Aleukie erforderlich waren.

2.4.4 Diagnosestellung

Die Stachybotryotoxikose kann allgemein in mehrere Erscheinungsformen unterteilt werden:

1. Dermale Form, wobei nur die Haut und die mukösen Membranen betroffen sind
2. Generalisierte Toxikose, mit vorherrschenden Veränderungen des Blutbildes und der blutbildenden Organe
3. Nervöse Form
4. Aborte

(HINTIKKA, 1977)

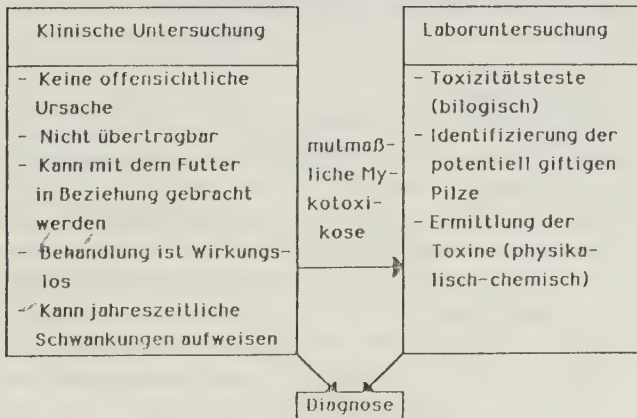


Abbildung 4: Kriterien zur Diagnosestellung einer Mykotoxikose (SHREEVE et.al. 1975)

Die Diagnosestellung bei einer Mykotoxikose erfolgt aufgrund der klinischen Untersuchung und der ergänzenden Laboruntersuchung (vgl. Abbildung 4).

2.4.5 Prophylaxe und Therapie

Besondere Bedeutung kommt der Prophylaxe zu. Dabei sollte darauf geachtet werden, daß die Futtermittellagerung sachgemäß erfolgt und die Tiere nur mit Futtermitteln und Einstreu von guter Qualität versorgt werden. Ein verdächtiges Futtermittel sollte sofort einer gründlichen Untersuchung unterzogen werden.

DANKO und TANYI (1968) fanden heraus, daß der Pilz *Stachybotrys atra* bevorzugt Futter von sauren Böden befällt. Eine Kalkdüngung des Bodens kann hier eine prophylaktische Maßnahme darstellen (zit. HINTIKKA, 1977).

Bei klinisch manifester Erkrankung muß als erstes das kontaminierte Futter entfernt werden; eine symptomatische Therapie beim erkrankten Tier allein ist nicht ausreichend (HINTIKKA, 1977).

An Wiederkäuer sollten keine angesäuerten Futtermittel, wie Silage, wegen der erhöhten Gefahr einer Verstärkung der Toxinwirkung bei niedrigen pH-Werten, verabreicht werden. Durch alkalische Behandlung des toxischen Futters besteht die Möglichkeit zur Detoxifizierung (HINTIKKA, 1977).

2.4.6 Toxinwirkung

Die Angriffsweise der verschiedenen Toxine im Organismus ist noch nicht vollständig erforscht. Es ist bekannt, daß alle Trichothecene potente Inhibitoren der Protein- und DNS-Synthese in eukaryontischen Zellen darstellen, so daß darauf deren Zelltoxizität zurückgeführt wird. Die Hemmung verschiedener Phasen der Proteinsynthese wird durch die Bindung der Trichothecene an ribosomale Strukturelemente bewirkt. Die Epoxydgruppe von vielen biologisch aktiven Metaboliten kann enzymatisch oder nicht enzymatisch mit SH-Gruppen der Aminosäuren und Proteinen reagieren (UENO, 1977).

Gelangen Trichothecene in den Körper, treten als Folge der

Wechselwirkung zwischen diesen und den sich aktiv teilenden Zellen des Körpers, insbesondere im Magen-Darmtrakt und im Knochenmark, weitverbreitete Hämorrhagien auf. Die bei Erkrankungsfällen beobachtete Hauttoxizität, sowie die Hämorrhagien sind möglicherweise hauptsächlich auf das Vorhandensein der Epoxydgruppe im Molekül zurückzuführen (PATTERSON, 1977).

Noch sehr wenig ist über den Metabolismus der Trichothecene bekannt. In der Leber von Ratten und Enten ist jedoch ein Enzym festgestellt worden, welches die hautnekrotisierende Eigenschaft von Trichothecenen zerstört. Obwohl man ursprünglich annahm, daß es sich um ein mikrosomales Enzym handelt, haben neuere Arbeiten gezeigt, daß zumindest bei Ratten auch Glutathione-S-Epoxydtransferasen diesbezüglich eine Rolle spielen können (PATTERSON, 1977).

Eine Reaktion mit den Sulfhydrylgruppen von Proteinen könnte fundamental für die toxische Reaktion mit der Haut und unter Umständen auch mit der Darmmukosa sein. Da es reichlich Möglichkeiten für die Reaktion mit Sulfhydrylgruppen vor und nach Absorption im Intestinaltrakt gibt, ist es schwer vorstellbar, daß unverändertes Toxin das Knochenmark erreicht. Aus diesem Grund besteht zu der Annahme Veranlassung, daß ein noch unbekannter Metabolit letztendendes die Knochenmarkschädigung verursacht.

2.5 Stachybotrystoxine

Stachybotrystoxine gehören zu den Sesquiterpenen und stellen makrozyklische Trichothecene dar. Sie besitzen ein Grundgerüst mit einem tetracyclischen Trichothecan-Skeleton, das über eine olefinische Bindung zwischen C-9 und C-10 sowie über eine Epoxyd-Gruppe bei C-12, C-13 verfügt, weswegen diese Toxine auch als 12,13-Epoxy-trichothec-9-ene bezeichnet werden, ferner weisen sie einen makrozyklischen Ring zwischen C-4 und C-6 auf.

Diese Stoffe zeichnen sich über eine hohe biologische Aktivität aus. Sie können insektizide, antifungale, antivirale, antibakterielle, phytotoxische, cytotoxische und cytostatische Eigenschaften entfalten. Darüberhinaus übertrifft die akute Toxizität gegenüber Säugern und Vögeln die der nicht-makrozyklischen Trichothecene (PATTERSON, 1977).

Makrozyklische Trichothecene werden außer von *Stachybotrys* auch von *Myrothecium* (*roridum*, *verrucaria*), *Verticimonosporium* (*diffRACTUM*), *Cylindrocarpon* sowie von *Baccharis megapotaMICA* und *cordifolia* gebildet (BERNSTEIN et.al., 1979; HABERMEHL et. al. 1984). (vgl. Kapitel 2.6)

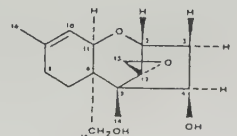
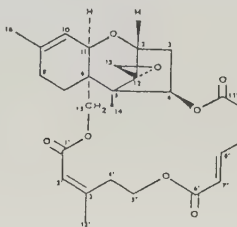
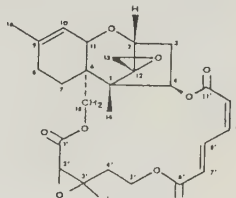
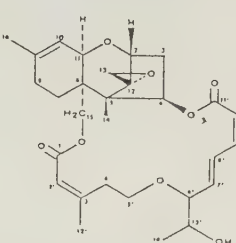
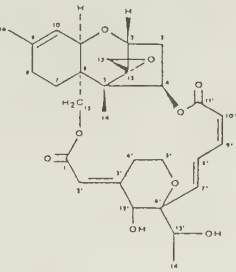
Bis heute sind von toxinbildenden *Stachybotrys*-Stämmen mehrere verschiedene Toxine isoliert und identifiziert worden (vgl. Tabelle 23). Außer diesen Toxinen produzieren die *Stachybotrys*-Isolate Mellein und Alkohole (SVISHCHUK et.al, 1973; TURNER und CALDRIDGE 1983).

Die hauptsächlich von *S. atra* gebildeten Toxine waren nach HARRACH et. al. (1983) Satratoxin G und H. Die Autoren machen daher diese Toxine für die Toxikose auf dem Feld verantwortlich. Sie fanden *S. atra* am häufigsten auf Stroh, auf Getreide wird er normalerweise von anderen Pilzen überwuchert.

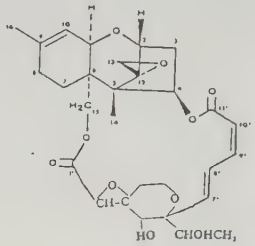
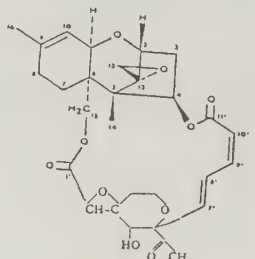
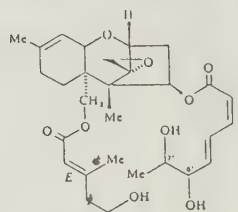
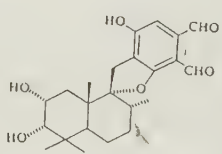
Nach SARKISOW (1954) verläuft die Toxinbildung simultan zur Sporenbildung und Pigmentproduktion. Die Beobachtungen von CROFT et.al. (1986) sprechen dafür, daß sich die Toxine in den Sporen anreichern.

DANKO und TANYI (1968) berichten, daß toxinproduzierende Stämme dunkleres Myzel entwickelten als nicht toxische Stämme. Nach KORPINEN und UOTI (1974), EL-KADY (1981) und SARKISOW (1954) besteht jedoch keine Korrelation zwischen Farbe und Toxinbildung.

Tabelle 23: Stoffwechselprodukte des *Stachybotrys atra*
(COLE u. COX, 1981; TURNER u. ALDRIDGE, 1983)

Verrucarol	$C_{15}H_{22}O_4$	266.1517	
Verrucarín J	$C_{27}H_{32}O_8$	484.2114	
Verrucarín B	$C_{27}H_{32}O_9$	500.2045	
Roridin E	$C_{29}H_{38}O_8$	514.2449	
Satçotoxin H	$C_{29}H_{36}O_9$	528.2349	

Fortsetzung Tabelle 23:

Satratoxin G	$C_{28}H_{32}O_{11}$	
Satratoxin F	$C_{29}H_{34}O_{10}$	
Trichoverrin A	$C_{29}H_{40}O_9$	a: (6'S,7'S), trichoverrin A
Trichoverrin B	$C_{29}H_{40}O_9$	b: (6'S,7'R), trichoverrin B
		
K-76		

Die für Stachybotryotoxikose verantwortlichen Toxine gehören wie die anderen Mykotoxine zu den Metaboliten des Sekundärstoffwechsels von Pilzen. Es handelt sich um Stoffe, die nur bei bestimmten Kulturbedingungen von Entwicklungsphasen gebildet werden, unter natürlichen Bedingungen meist nur in sehr kleinen Mengen vorkommen und offensichtlich beim Produzenten keine Stoffwechselfunktion zu erfüllen haben (BULOCK, 1961). Dabei liefern Zwischenprodukte des Primärstoffwechsels die Ausgangssubstanzen für deren Synthese (REIB, 1981).

Es wird angenommen, daß es in einem Pilzthallus jeweils eine gewisse Anzahl von Kernen gibt, die über die genetische Information für die Mykotoxin-Synthese verfügen. Je nach Umweltbedingungen können sich die einen oder anderen eher an das Milieu anpassen, so daß eindeutig eine Abhängigkeit hinsichtlich der gebildeten Toxinmenge zu bestehen scheint, je nachdem ob das Substrat förderlich ist oder von außen einwirkende Milieufaktoren die Vorgänge hemmen (REIB, 1981).

Die verschiedenen Faktoren, die Wachstum und Toxinproduktion beeinflussen, können der Tabelle 24 entnommen werden. Anscheinend sind Temperatur, relative Luftfeuchte, spezifisches Toxinbildungsvermögen der Stämme und Befähigung zum kompetitiven Wachstum die wichtigsten Faktoren die bei der Manifestation einer Mykotoxikose auf dem Feld eine Rolle spielen (JARVIS, 1971).

Tabelle 24: Faktoren, die die Bildung von Mykotoxinen auf natürlichem Substrat beeinflussen.

1) Physikalische Faktoren
a) Temperatur
b) Lüftung
c) Licht
d) mechanische Schäden
2) Chemische Faktoren
a) Ernährungsfaktoren, anorganische Salze mit einbezogen
b) Anwendung von Fungiziden
3) Biologische Faktoren
a) Pilz-Stamm (nicht alle Stämme bilden Toxine)
b) Kompetitives Wachstum von Pilzen
c) Mikrobielle Detoxikation

2.6 Nachweisverfahren

Die Identifizierung der verschiedenen Stachybotrys-Toxine erfolgt mit physikalisch-chemischen Methoden, von denen hauptsächlich die Dünnschichtchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie Bedeutung erlangt haben (HARRACH et.al., 1983; JARVIS et.al. 1986). Nach alkalischer Hydrolyse der makrozyklischen Trichothecene ist auch ein Nachweis mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie des entstehenden Verrucarols möglich, wodurch indirekt die makrozyklischen Trichothecene nachgewiesen werden können (HARRACH et.al., 1981).

Biologische Nachweisverfahren werden als Screening-Methode eingesetzt um die Toxizität von Pilzextrakten und eventuell mit Mykotoxinen kontaminierten Lebens- und Futtermitteln beurteilen zu können. Dazu eignen sich die in Tabelle 25 zusammengestellten Testverfahren. Hühnerembryotest und Zellkulturtest u.a. eignen sich auch für die Untersuchung der Wirkungsweise und des Metabolismus.

In Tabelle 26 sind einige in der Mykotoxinforschung Verwendung findende biologische Testverfahren aufgeführt.

Der **Hauttoxizitätstest** wurde zum ersten Mal angewandt um nach chemischer Fraktionierung der Extrakte aus überwinterter Hirse das toxische Prinzip zu studieren. Dabei stellte sich die Eignung des Tests für das Screening der Trichothecene bildenden Pilze heraus (GILGAN et. al. 1966), da die Metaboliten größtenteils hautreizend wirken.

BODON und PALYUSIK (1970) fanden heraus, daß eine intradermale Injektion von 5mg toxischen Stachybotrysextraktes auf Rattenhaut nekrotische Veränderungen an der Injektionsstelle verursachte.

CHUNG et. al. (1974) untersuchten die hautreizende Wirkung mehrerer Trichothecene und gelangten zu dem Ergebnis, daß die Haut am empfindlichsten auf makrozyklische Trichothecene und T-2 Toxin reagiert. Von allen Versuchstieren zeigte das Meerschweinchen die höchste Sensitivität (UENO, 1977).

Nach PATTERSON (1977) könnte die Reaktion der Sulfhydrylgruppen der Proteine mit den Trichothecenen auf molekularer Basis die Erklärung für die Gewebeschädigung liefern (vgl. Kapitel 2.5).

Tabelle 25: Biologische Testsysteme zum Nachweis von Mykotoxinen.

Hauttest:	
Maus	GILGAN et.al., 1966
Ratte	BODON und PALYUSIK, 1970
Meerschweinchen	WEI et.al., 1972
Kaninchen	CHUNG et.al., 1974
Hühnerembryotest	GEDEK, 1972
	ICHINOE et.al., 1972
Zelltoxizitätstest:	
Ehrlich ascites Tumorzellen	UENO und FUKUSHIMA, 1968
Menschliche KB-Zellen	BAMBURG, 1972
Kaninchen - Retikulozyten	UENO et.al., 1969
HeLa-Zellen	CARTER und CANNON, 1977
Vero-Zellen	CUNDCLIFFE und DAYIES, 1977
Mauslymphozyten	GYONGYOSSY-ISSA und KHA-
BHK-Zellen	CHATOURIANS, 1964
Mausfibroblasten	KORPINEN et.al., 1974
Epitheliale Külbernierenzellen	BODON und PALYUSIK, 1970
Lymphomazellen der Maus	TANAKA et.al., 1977
Phytotoxizitätstest	BRIAN et.al., 1961
Zwiebel (<i>Allium cepa</i>)	LINNAINMAA et.al., 1979
Erbsensämlinge	MARASAS et.al., 1972
Protozoen	UENO et.al., 1970c
Paramecium caudatum	BODON und PALYUSIK, 1970
Tetrahymena pyriformis	UENO und YAMAKAWA, 1970
Insekten	
Reismottenlarven (<i>Corcyra cephalonica</i>)	PARATHASARATHY et.al.,
Rheinschnakenlarven (<i>Aedes vexans</i> MEIGEN)	SCHMIDT, 1983
<i>Drosophila melanogaster</i>	SORSA et.al., 1980
Beine shrimp (<i>Artemia salina</i>)	EPPLEY, 1974
Zebrabärbling	BRESCH und FRANK, 1985
Pilze (z.B. Hefen)	BURMEISTER et.al., 1970

Tabelle 26: Empfindlichkeit verschiedener Zellsysteme gegenüber makrozyklischen Trichothecenen (BAMBURG, 1972; KORPINEN, 1974; UENO, 1977)

* Toxin	BHK	ID ₅₀ Mauslu- morz. (P815)	ID ₅₀ HEK	ID ₅₀ HC	Kaninchen- retikulo- zyten	HeLa	Hep ₂	Mäusefib- roblasten
	mg/ml	ng/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml
RoA		1	0,003	0,003		0,003		0,03
RoH							0,025	
VerA	1,5	1	0,002	0,003	10-15 (50%)	0,005	0,001	0,1
VerB		1				0,005	0,005	
Ver							7	
Tri	75		0,1	0,003	0,5 (80%)	0,1	0,075	
Tric					10-15 (50%)			

* Abkürzungen

RoA	=Roridin A	Ver	=Verrucarol
RoH	=Roridin H	Tri	=Trichothecin
VerA	=Verrucarin A	Tric	=Trichothecolon
VerB	=Verrucarin B		

Aufgrund der allgemeinen Zytotoxizität scheinen alle Trichothecene zytopathische Effekte in Säugerzellkulturen hervorzurufen. Dabei sind Zellen, die sich noch in Teilung befinden, um ein Mehrfaches empfindlicher als sich nicht teilende Zellen, wie sich am Beispiel der Hühnerembryofibroblasten zeigte (BAMBURG, 1972).

Trichothecene hemmen die Protein- und DNS-Synthese zumindest in Kaninchenretikulozyten, Ehrlich ascites Tumorzellen, zellfreien Retikulozyten und ribosomalen Systemen aus Rattenleber. Es wurde postuliert, daß der zytostatische Effekt der Trichothecene aufgrund einer Hemmung der Proteinsynthese durch Bindung von Trichothecenen an ribosomale Strukturelemente zustande kommt. Versuche mit Zellkulturen haben gezeigt, daß die Zytotoxizität mit dem 12,13-Epoxytrichothecennukleus in Verbindung gebracht werden kann. Dabei darf nicht übersehen werden, daß auch andere Struktureigentümlichkeiten, z.B. das Vorhandensein von 9-ene und die Veresterung von einigen der Hydroxylsubstituenten, auch gewichtige Faktoren in Bezug auf die hohe Toxizität der Stoffe

darstellen (UENO et.al., 1968; UENO und FUKUSHIMA, 1968; UENO et.al., 1969; PATTERSON, 1977). Dadurch ist Vorsicht geboten hinsichtlich der Interpretation des Wirkungsmechanismus nur auf Basis der Proteinsynthesehemmung, denn das aktivste zytostatische Trichothecen, Verrucarín A, zeigte sich als eines der am wenigsten potenten Proteinsynthesehemmer in Kaninchenretikulozyten (BAMBURG, 1972).

Der Grad der Toxinwirkung auf verschiedene Zellsysteme wird in der Tabelle 26 erläutert.

Tabelle 27: Wirkung von Stachybotrys- Rohtoxin auf epitheliale Kälbernieren-Zellen (BODON und PALYUSIK, 1970)

Proben	Verdünnungsstufen ug/ml						
	23,5	2,35	2,35x 10 ¹	2,35x 10 ²	2,35x 10 ³	2,35x 10 ⁴	2,35x 10 ⁵
1	+	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	+	-

CUNDCLIFFE und DAVIES (1977) untersuchten die Wirkung von verschiedenen 12,13-Epoxytrichothecenen auf H-HeLa-Zellen. Sie unterteilten die Toxine je nach Wirkungsweise in drei verschiedene Typen I-Typ, E-Typ und T-Typ. Roridin A und Verrucarín A waren gemäß dieser Einteilung dem I-Typ zuzuordnen. Die I-Typ-Reaktion verursachte einen schnellen Zerfall der Polyribosomen. Das weist darauf hin, daß die Initiationsphase der Proteinsynthese gehemmt wurde oder sich neu bildende Ribosomen beeinflusst wurden. Bei diesen Untersuchungen unterbanden die I-Typ-Inhibitoren die Proteinsynthese innerhalb von 2-3 Minuten, wenn die zugesetzte Menge 1mg/ml betrug.

Trichothecin gehörte stattdessen zu den E-Typ-Inhibitoren. Dieser Typ rief eine Reaktion hervor, die einer Hemmung der Verlängerung der entstehenden Polypeptidkette entsprachen (Stabilisierung des Ribosomprofils). Bei diesem Typ handelte es sich somit um einen weniger potenten Proteinsynthesehemmer als Typ-I.

Außer gegenüber Tieren und Säugetierzellkulturen entfalten Trichothecene auch eine toxische Wirkung gegenüber höheren Pflanzen. Nach Phytotoxizitätsversuchen hemmen Trichothecene das Wachstum oder die Keimung von Samen der höheren Pflanzen. Dabei erwiesen sich wiederum T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol als stärker toxisch wie Trichothecin und Trichodermin. Mengenangaben zur Wirkung der Trichothecene wie bei den anderen Testsystemen liegen hierüber im einzelnen nicht vor (BAMBURG, 1972).

KUPCHAN et.al. (1976) berichten über die Aktivität eines Extraktes, welcher vom brasilianischen Busch *Baccharis megapotamica* SPRENG (Asteraceae) gewonnen worden war, gegen P-388 Mausleukemie in vivo (JARVIS et. al. 1980). Es stellte sich heraus, daß dieser Extrakt der Pflanze mehrere den makrozyklischen Trichothecen verwandte Stoffe (Baccharinoide), mit ca. 0.02% in der Trockenmasse enthielt (JARVIS und MAZZOLA, 1982). Es zeigte sich daß die Pflanze fähig war, eine bestimmte Menge eines potenten Antibiotikums aufzunehmen, dieses chemisch zu modifizieren und zu deponieren, ohne selbst dabei krank zu werden (JARVIS et. al. 1981). HABERMEHL et. al. (1984) konnten Roridin E und Roridin A in dem Extrakt von *Baccharis cordifolia*, einer in Brasilien und Argentinien beheimateten Giftpflanze, nachweisen.

VERRETT et. al. (1964) und GEDEK (1972) untersuchten u.a. die Wirkung von Mykotoxinen auf Hühnerembryonen. In diese Untersuchungen waren keine Toxine der *Stachybotrys*-, *Alternaria*- oder *Trichothecium* spp. einbezogen worden. Es zeigte sich aber, daß nichtmakrozyklische Trichothecene eine toxische Wirkung auf die Hühnerembryonen ausübten (GEDEK, 1972; VESELY et. al., 1984).

Als LD₅₀ für Hühnerembryonen betreffend *Stachybotrystoxin* wurde nach BODON und PALYUSIK (1970) Werte ermittelt, die je nach Alter der Embryonen zwischen 35,9 - 175,5 µg lagen.

Die Menge an *Stachybotrystoxin*, die für *Paramecium caudatum* noch toxisch war, betrug 20 mg/l Medium.

EPPLEY (1974) testete verschiedene von *Stachybotrys* gebildete Toxine unter Verwendung von Brine shrimps als biologisches Testverfahren und machte mengenmäßige Angaben (LC₅₀) zu deren Wirkung (vgl. Tabelle 28).

Tabelle 28: Brine shrimps Empfindlichkeit gegenüber Stoffwechselprodukten von *Stachybotrys atra* im Test nach EPPLEY, 1974.

Toxin *	LC ₅₀ in ng bei 30 °C		LC ₅₀ in ng bei 35 °C	
	16 Std.	24 Std.	16 Std.	24 Std.
RoA	100	80	70	70
RoE	130	-	100	100
RoH	70	20	40	20
VerA	80	20	20	15
VerB	100	80	50	50
Ver	>4000	>4000	>4000	-
SF	150	100	80	-
SG	150	100	100	-
SH	200	150	100	-

Die Untersuchung basierte auf 22 Tests

* Abkürzungen:

RoE = Roridin E SH = Satratoxin H
 SF = Satratoxin F andere vgl. Tabelle 26
 SG = Satratoxin G

BRESCH und FRANK (1985) zogen u.a. frühe Entwicklungsstadien des Zebrafisches (*Brachidanio rerio*) für ein Satratoxin J und H-Screening heran. Die niedrigste Konzentration, unter der noch Effekte zu sehen waren, betrug bei diesen beiden Toxinen 1,2 mg/l.

Sowohl *Stachybotrys atra*- als auch *Trichothecium roseum*-Stämme waren wie andere Fungi imperfecti in der Lage Substanzen mit antifungaler Wirkung zu bilden. Von *Stachybotrys atra* wurden desweiteren auch Verbindungen mit antibakteriellen Eigenschaften gebildet (BRIAN and HEMMING, 1946; BUTT und CHAFFAR, 1972). BUTT und CHAFFAR (1972) berichten über ein *Stachybotrys*-Isolat, welches u.a. auch das Wachstum von *Allescheria boydii* hemmte.

Neben den allgemeinen Phänomenen der Zytotoxizität werden auch mutagene Effekte überprüft. Satratoxin H hemmte beispielsweise *Allium cepa*-Zellen in der Metaphase. Es wurden aber keine Chromosomenbrüche induziert. Auch im Ames-Test mit *Salmonella* zeigte Satratoxin H keine mutagene Wirkung (LINNAINMAA et. al. 1979). Die Untersuchung von SORSA et.al. (1978) an *Drosophila melanogaster* zur Bestimmung der geschlechtsabhängigen rezessiven Lethale verlief unter Verabreichung von Satratoxin H negativ.

3. GENUS ALTERNARIA

3.1 Arten

Die Unterscheidung von Arten dieses Genus *Alternaria* ist schon wegen der großen Varianz in den Merkmalen Form, Größe und Septierung von Sporen innerhalb der einzelnen Art sehr schwierig. Die ersten umfangreichen Beschreibungen dieser Gattung stammen von NEERGARD (1945) und Joly (1964) (zit. BARRON, 1968).

Später stellte ELLIS (1971) 27 verschiedene *Alternaria*-Arten vor, deren Benennung hauptsächlich, dem Wirt Rechnung trägt, aus dem sie isoliert worden waren. Die Tabelle 29 informiert über die einzelnen *Alternaria*-Arten und deren Synonyme nach ELLIS (1971). Tabelle 30 enthält dagegen *Alternaria*-Arten, die an verschiedenen Stellen in der Literatur erwähnt werden.

Tabelle 29: *Alternaria*-Arten und deren Synonyme nach ELLIS (1971).

Art	Synonyme
<i>Alt. alternata</i> =	<i>Alt. tenuis</i>
<i>Alt. citri</i>	
<i>Alt. brassicola</i> =	<i>Helminthosporium brassicola</i> <i>Alt. circinans</i> <i>Alt. oleracea</i>
<i>Alternaria</i> Stadium von <i>Pleospora infectoria</i>	
<i>Alt. chrysanthemi</i>	
<i>Alt. radicina</i> =	<i>Thyrospora radicina</i> <i>Stemphylium radicinum</i> <i>Pseudostemphylium radicinum</i>
<i>Alt. cheiranthi</i> =	<i>Helminthosporium cheiranthi</i> <i>Macrosporium chieranthi</i>
<i>Alt. raphani</i> =	<i>Alt. matthiolae</i>
<i>Alt. dianthi</i>	
<i>Alt. sonchi</i>	
<i>Alt. tenuissima</i> =	<i>Helminthosporium tenuissimum</i> <i>Macrosporium tenuissimum</i>
<i>Alt. longipes</i> =	<i>Macrosporium longipes</i>
<i>Alt. dianthicola</i>	
<i>Alt. longissima</i>	
<i>Alt. brassicae</i> =	<i>Macrosporium brassicae</i>
<i>Alt. solani</i> =	<i>Macrosporium solani</i>
<i>Alt. crassa</i>	<i>Cercospora crassa</i> <i>Cercospora daturae</i> <i>Macrosporium daturae</i> <i>Alt. daturae</i>
<i>Alt. porri</i> =	<i>Macrosporium porri</i>
<i>Alt. carthami</i>	
<i>Alt. sesami</i> =	<i>Macrosporium sesami</i>
<i>Alt. dauci</i> =	<i>Sporidesmium exitiosum</i> KUEHN var. <i>dauci</i> <i>Macrosporium carotae</i>
<i>Alt. passiflorae</i>	
<i>Alt. cichorii</i>	
<i>Alt. cucumerina</i> =	<i>Macrosporium cucumerinum</i>
<i>Alt. padwickii</i> =	<i>Trichoconis padwickii</i>
<i>Alt. macrospora</i> =	<i>Sporidesmium longipedicellatum</i> <i>Alt. longipedicellata</i>
<i>Alt. ricini</i> =	<i>Macrosporium ricini</i>

Tabelle 30: Aufstellung über in der Literatur zitierten Alternaria-Arten.

Artnamen	Referenzen
Alt. tomato	ARAGAKI, 1961 KUMAGAI und ODA, 1973, 1983
Alt. zinniae	LEACH, 1962
Alt. consortiale (THUEN) GROVES und HUGHES	BLUNT und BAKER, 1968 RANZONI, 1968
Alt. dendritica CAYARA	RANZONI, 1968
Alt. longipes	DOUONIK und SOBERS, 1968
Alt. tritici PARASADA und PRABHU	BOHWMIK, 1969 MAGAN et.al., 1984 FRANCA und CARETTA, 1984
Alt. brassicola	CAMPBELL, 1969
Alt. bataticola IKATA ex YAMAMOTO	NAKAJIMA, 1973
Alt. mali (ROBERTS)	SLIFKIN et.al., 1973
Alt. chlamydospora MOUCHACCA	ABDEL-HAFEZ, 1984
Alt. grisea SZILVINYI	ABDEL-HAFEZ, 1984 MAZEN et.al., 1984
Alt. geophila DASZE/WSKA	MAZEN et.al., 1984
Alt. cinerariae	ROBESON und STROBEL, 1985
Alt. humicola	WADHWANI und SRIYASTAYA, 1985
Alt. pluriseptata	WADHWANI und SRIYASTAYA, 1985
Alt. helianthi	TAL et.al., 1985
Alt. eichhorniae	TURNER und ALDRIDGE, 1983

3.2 Mykologische Daten

Alternaria-Spezies wachsen auf den in der mykologischen Diagnostik üblicherweise Verwendung findenden Nährböden, wie Sabouraud-Dextrose- und Czapek Dox-Agar.

Bei einer Untersuchung von 30 Weizenproben isolierten MAZEN et.al. (1984) *Alt. alternata* von Czapek-Agar mit Glucose-, Zellulose-, oder Saccharosezusatz, *Alt. grisea* von Czapek-Glucose-Agar, *Alt. tenuissima* von Czapek mit Glucose- oder Saccharosezusatz und *Alt. geophila* von Czapek-Glucose- und -Saccharose-Agar.

Von Bildseiten alter Schriften isolierte *Alternaria*en sporulierten besser auf Filterpapier- als auf Malz-Agar (BURGE et. al., 1977). Zugaben von Phosphat in Form von KH_2PO_4 zu einem Phosphatmangelmedium zu verschiedenen Zeiten der Züchtung hatten keinen Einfluß auf Zunahme der Biomasse von *Alt. alternata* (vgl. Toxinbildung). Proteinsynthesehemmer wie p-Fluorophenylalanin und Cycloheximid bewirkten stattdessen eine Stagnation oder verursachten eine totale Hemmung des Wachstums in Abhängigkeit von Menge und Zeitpunkt der Zugabe (EDEL et.al. 1985).

MAGAN und LACEY (1985) konnten mehr als 2/3 der von ihnen isolierten *Alternaria alternata* Stämme anzüchten, wenn das Getreide direkt auf 2%-igen Malzextraktagar aufgebracht wurde. Nur ein geringer Prozentsatz entwickelte sich nach vorheriger Suspension im Wasser. Die Untersuchungen ergaben zunächst einen verschwindend kleinen Anteil von *Alt. alternata*, nach 4-wöchiger Lagerung des Getreides machte dieser jedoch 50% aus.

Die Bedeutung der Temperatur für die Art des Wachstums von *Alt. cichorii* wurde von VAKALOUNAKIS und CHRISTIAS 1985 erkannt. Sie fanden heraus, daß der Pilz bei niedrigen Temperaturen (15 °C) große Konidien mit kurzem Schnabel, bei hohen Temperaturen kleine Konidien mit langem Schnabel entwickelt. Temperaturen über 25 °C führten zu einer Umwandlung der Konidiophoren in sterile Hyphen, wobei eine Ausbreitung im Ausmaß des vegetativen 'Umwuchses' sich abzeichnete, je höher die darauf einwirkende Temperatur war (Kartoffel-Dextrose-Agar). (VAKALOUNAKIS et.al. 1983)

Nach REIB (1981) ist ein hoher Wassergehalt (24-25%) des Substrates Voraussetzung für das Wachstum. Bei Abnahme des Wassergehaltes z.B. im Getreide von unter 18% stellte der Pilz sein

Wachstum ein (SPICHER, 1981).

Blaues Licht hemmte die Konidienbildung bei *Alt. cichorii* (PDA), eine nachfolgende UV-Bestrahlung machte diese Wirkung rückgängig, so daß jeweils die zuletzt einwirkende Strahlung die Sporulation maßgebend beeinflusste (VAKALOUNAKIS und CHRISTIAS, 1981). *Alternaria solani* konnte nach Einwirkung von Sonnenlicht zur Sporulation veranlaßt werden (KUMAGAI und ODA, 1969; LUKENS, 1963).

Alternaria alternata bildete mehr Pigmente nach Einwirkung von weißem und blauem Licht (HAGGBLOM und UNESTAM, 1979). Die *Alternaria*-Kolonien breiten sich räumlich weit aus und zeigen ein Farbenspiel, welches von grau über schwarz bis hin zu braun reicht (ELLIS, 1971).

Über die Unterschiede in der Mikromorphologie der *Alternaria*-Arten informiert detailliert Tabelle 31.

Alternarien bilden Substrat- und Luftmyzel, ihre Hyphen sind farblos, olivbraun oder braun; ihre Konidiophoren erscheinen makronematös, mononematös, einfach oder unregelmäßig verzweigt, blaß braun bis dunkelbraun und treten einzeln oder in Anhäufungen auf (ELLIS, 1971).

Bei *Alternarien* kann ein Konidium die Fruktifikation einer konidiogenen Zelle übernehmen (BARRON, 1968).

Alternariasporen sind Porosporen, die in akropetaler Reihenfolge gebildet werden (SUBRAMANNIAN, 1972).

Die Wand einer reifenden Spore von *Alt. brassicola* besteht wahrscheinlich aus Chitinfasern. Das Plasmalemma hat rechtwinklige Furchen auf der äußeren Fläche und entsprechende Ausbuchtungen im Inneren (vgl. Abbildung 5). Das endoplasmatische Retikulum bildet Lamellen oder ist vesikulär. Sein Mitwirken bei der Wandbildung ist bestätigt. Die vom endoplasmatischen Retikulum gebildeten Vesikel verschmelzen mit dem Plasmalemma. Nuclei, Mitochondrien und Vakuolen sind ebenfalls gefunden worden (CAMPBELL, 1969).

Jede Zelle einer reifen Spore von *Alt. brassicola* hat eine zweischichtige Wand, wobei die vom Protoblasten weiter entfernte Schicht melanisiert ist. Die reifen Septen sind fünfschichtig und besitzen je eine Pore (CAMPBELL, 1969).

Neue Sporen entwickeln sich entweder aus Mutterzellen an den

Tabelle 31: Mikromorphologische Merkmale von Konidiophoren und Konidien der verschiedenen Alternaria-Arten (ELLIS, 1971).

Art	Konidiophoren			Konidien			Kettenbildung	Form	Schnabel	Oberfläche	Septen
	Farbe	Konidiogene Narben	Größe Länge um Breite um	Farbe	Größe Länge um Breite um	Größe Länge um Breite um					
<i>A. alternata</i>	bläß bis oliv od. goldbraun	1- mehrere	50	3-6	bläß bis mittel goldbraun	20-63	9-18	lang, oft verzweigt	kellartig, birnenartig, eiförmig od. ellipsenförmig	oft konisch od. zylindrisch, manchmal bis 1/3 der Konidienlänge, bläß, 2-5 µm dick	bis 8 transv., oft mehrere longit., od. schräge
<i>A. citri</i>	bläß bis mittelbraun od. olivbraun	1 terminale, manchmal 1-2 laterale	300	3-5	bläß bis mittel, manchmal dunkel- od. olivbraun	8-60	6-24	keine od. einfache od. verzweigte von 2-7 Sporen	gerade od. leicht gebogen, oft kellartig, oval, od. schnabelartig	meist 8 µm od. weniger lang, 2,5-4 µm dick, hyalin od. bläß braun	bis 8 transv., mehrere longit., od. schräge, eingeengt an den Septen
<i>A. brassicicola</i>	bläß bis mittel olivbraun		70	5-8	bläß bis olivbraun	10-130	8-20	mistens bis 20 Sporen od. mehr, manchmal verzweigt	gerade, fast zylindrisch, sich zur Spitze hin verjüngend od. kellartig, basale Zelle abgerundet	1/6 der Konidienlänge, 6-8 µm dick, oft nicht gebildet	1-11, meist weniger als 6 transv., normal einige bis 6 longit., oft leicht eingeengt an den Septen
<i>A. Form von pleospora infectoria</i>	bläß bis goldbraun	1- mehrere	bis 80	3-6	bläß bis mittel goldbraun	26-70	9-18	lang, verzweigt	konisch, birnenartig od. kellartig, sich zum Schnabel hin verjüngend	1/2 der Konidienlänge, oft an der Spitze angeschwollen, 3-5 µm dick	bis 8 transv., normalerweise mal nahe beieinander mehrere longit., od. schiefe
<i>A. chrysanthemi</i>	bläß od. mittel oliv- od. goldbraun	normal 1-3	bis 100	6-11	hyalin bis bläß oliv od. goldbraun	25-130	20-26	keine	gerade od. leicht verbogen, oft zylindrisch, manchmal kellartig	glatt	bis zu 9 (12) transv., 1 od. mehr longit., oft leicht eingeengt an den Septen
<i>A. radicina</i>	bläß od. mittelbraun od. olivbraun	1 od. mehr	200	3-9	mittel bis dunkel- oliv- od. olivbraun	27-57	5-27	keine, od. von 2 od. 3 Sporen	ellipsenförmig, oft birnenartig		3-7 transv., 1 bis mehrere longit., od. schiefe
<i>A. cheiranthi</i>	bläß oliv, oft hyalin an der Spitze	1 terminal, bis 4 eng beieinander	130	5-8	leicht oliv- bis goldbraun, oft durchscheinend mit dunkler Innenseite	20-100	3-32	meistens keine, selten von 2-3 od. mehr Sporen	birnenförmig, oft eiförmig od. langlich, später irre gular		mehrere

Art	Konidiophoren		Konidien				Kettenbildung	Form	Schnabel	Oberfläche	
	Farbe	Konidiogene Narben	Größe Länge µm	Breite µm	Farbe	Größe Länge µm	Breite µm				
<i>A. raphani</i>	olivbraun	normal 1	150	3-7	mittel bis dunkel- braun, oft olivbraun	50-130	14-30	gerade od. leicht gebogen, keil- förmig od. ellipsoid	normal kurz	glatt od. verrukt	3-7 transv. oft meh- rere longit. od. schiefe an Septen eingeengt
<i>A. dianthi</i>	bläß bis mittel- braun	1 - mehrere	bis 120	5-8	braun od. oliv- braun, oft ziemlich dunkel im Alter	50-120	10-25	gerade od. leicht gebogen, konisch bis keilförmig	leicht an der Spitze an- geschwollen, 2-70µm lang, 3-6µm dick	glatt	bis 9 transv., mehrere longit. od. schiefe, oft an Septen eingeengt
<i>A. sonchi</i>	bläß od. mittel- olivbraun od. braun	1-mehrere	bis 80	5-9	mittel bläß bis goldbraun od. olivbraun	60-130	15-26	gerade od. gebogen keilförmig od. konisch	kurz, dick, an der Basis abgerundet, 4-10µm, sich verjüngend	glatt, manchmal verrukt	4-8 transv., 0-einige longit. od. schiefe oft an Septen einge- engt
<i>A. tenuissima</i>	bläß od. mittel- bläßbraun	1-mehrere	bis 115	4-6	bläß bis mittel- goldbraun	22-95	8-19	gerade od. leicht gebogen, keil- förmig od. kör- perlich ellipsoid sich zum Schnabel hin verjüngend	1/2 der Konidienlänge, normal kürzer, manch- mal verjüngt, oft an der Spitze angeschwol- len, 2-4µm dick, Apex 4-5µm	glatt, manchmal verrukt	4-7 transv., mehrere longit. od. schiefe, an Septen leicht od. nicht eingeengt
<i>A. longipes</i>	bläß bis oliv- braun	1-mehrere	bis 80	3-5	bläß bis mittel- bläßbraun	35-110	11-21	keilförmig, schne- belartig	1/3-1/2 der Konidi- enlänge, oft an der Spitze angeschwol- len, 2-5µm dick	glatt od. verrukt	3-7 transv., 1 bis mehrere longit. od. schiefe
<i>A. dianthicola</i>	bläß olivbraun		150	4-6	bläß oliv- braun	55-130	10-16	gerade od. ge- krümmt, keil- förmig od. fast zylind- risch	bläß olivbraun, manchmal Spitze aufgebläht, 3-6µm dick	glatt	bis 14 transv., gelegentlich 1-2 longit. od. schiefe an Septen eingeengt
<i>A. longissima</i>	bläß bis mittel- bläßbraun	1-mehrere	bis 150	3-5	bläß strohfar- ben bis braun	bis 500	4-17 Apex 2,5	schr. unter- schiedlich, oft lang, cercospora- artig (bis 500µm) keilförmig od. basal subzylind- risch	sehr lang, sep- tiert		5-40 transv.

Fortsetzung Tabelle 31:

Art	Konidophoren		Konidien		Kettenbildung	Form	Schmelz	Oberfläche	Septen
	Farbe	Konidiogene Narben	Größe Länge µm	Größe Breite µm					
A. brassicae	mittel blaß- grau oliv glatt	1 - mehrere	bis 170	6-11	keine od ge- legentlich von 4 Sporen	gerade od leicht gebogen, keilart- tig	1/5-1/2 der Konidi- enlänge, 5-9µm dick	glatt od gewarzt	6-19 transv. 0-8 longit. od. schiefe
A. solani	blaß braun od olivbraun		bis 110	6-10	normal keine	gerade od leicht gebogen, keilart- tig od körperl- anglich ellipsoid zur Spitze hin verjüngt	oft gleich lang mit Kör- per od länger, vortre- hend sich verjüngend, manchmal verzweigt 2,5- 5µm dick	glatt	0-11 transv. 0 bis einige longit. od. schiefe
A. crassa	blaß od mit- tel braun	1 - mehrere	90	7-10	keine od ge- legentlich sehr kurz	keilartig	blaß braun, allg viel länger als Konidien, 4-8µm dick, verjüngt 2-2,5µm	glatt	7-10 transv. mehrere longit.
A. porri	blaß bis mit- tel braun	1 - mehrere, gut deliniert	bis 120	5-10	normal keine	gerade od leicht gebogen, keilart- tig od körperl- ellipsoid	blaß, gleich lang, län- ger od kürzer als Kör- per, 2-4µm dick, ver- jüngt	glatt od verrukos	8-12 transv. 0 bis einige longit. od. schiefe
A. carthami	braun od oliv- braun, blasser in Apexgegend		bis 90	5-6	keine od sehr kurz	gerade od leicht gebogen, keilart- tig	25-160µm lang, 4-6µm dick, an der Basis ver- jüngt bis 2-3µm, bis 5 transv. Septen	glatt	7-11 transv. bis 7 longit. od. schiefe, an Septen eingeeengt
A. sesami	blaß braun od gelbbraun	1 - mehrere	bis 100	5-9	keine od manchmal von 2 Sporen	gerade od leicht gebogen, keilart- tig od körperl- anglich ellipsoid zur Spitze hin verjüngt	gleich od 2x Körperl- länge, evtl gestielt, blaß, 2-4µm dick	glatt	6-11 transv. einige od. mehrere longit. od. schiefe an Septen eingeeengt
A. dauci	blaß olivbraun od braun		bis 80	6-10	normal keine, gelegentlich von 2 Sporen	gerade od gebog- en, keilartig verjüngt	1-3x Körperlänge, ge- stelt, gebogen, hyalin od blaß, 5-7µm dick, Basis verjüngt bis 1-3µm	glatt	7-11 transv. 1 bis mehrere longit. od. schiefe

Art	Konidiophoren		Konidien		Kettenbildung	Form	Schnabel	Oberfläche	Septen
	Farbe	Große Länge µm Breite µm	Närb Farbe	Große Länge µm Breite µm					
<i>A. passiflorae</i>	bläß bis mittel bläß braun	bis 120 6-10	mehrere bläß bis mittel braun	100- 250 14-29	keine od. oft von 5 Sporen		gleichlang od. länger als Körper, evtl. ver- zweigt, Basis blaß, 1,5-4um dick	glatt, od. leicht verrukos	5-12 transv., einige longit. od. schiefe
<i>A. cichorii</i>	zieml. blaß oliv od. oliv- braun, am Apex fast hyalin	100 6-11	bläß bis mit- tel olivbraun od. braun	60-120 15-20	meist keine	gerade od. leicht gebogen, fusiform bis keilartig	evtl. verzweigt bis 280um lang, 1-2um dick breiter Basis 3-6um	glatt	8-11 transv 0-5 longit.
<i>A. cucumerina</i>	bläß bis mit- tel braun	110 6-10	bläß bis mit- tel goldbraun	130- 220 15-24	keine od. gele- gentlich von 2 Sporen	keilartig	länger als Körper, blaß braun, septiert, 4-5um dick, Basis 1- 2um	glatt bis verrukos	6-9 transv. mehrere longit. od. schiefe
<i>A. podwickii</i> (Sclerotien- bildung)		180 3-4	erst hyalin, später stroh- farben bis goldbraun	95-175 11-20		gerade od. gebo- gen, fusiform bis keilartig	1/2 der Körperlan- ge, 1,5-5um dick, 1-mehrere Septen	glatt od. gestachelt (in der Näc- he bennah)	3-5 meist 4 longit., manchmal Septen eingeeengt
<i>A. macrospora</i>	bläß bis mit- tel braun	80 4-9	mittel bis dun- kel rotbraun	90-180 15-22	keine od. manchmal von 2 Sporen	gerade od. gebo- gen, keilartig od. Körper ellipsoid zum Schnabel hin verjüngt	gleich od. 2x länger als Kör- per, blaß, 1- 1,5um dick	glatt, gelegentl., verrukos	4-9 transv. mehrere longit. od. schiefe, oft an Septen leicht eingeeengt
<i>A. ricini</i>	bläß braun	80 5-9	bläß bis mit- tel gelb, spä- ter braun od. rotl. braun	70-170 13-27	keine od. gele- gentlich von 2 Sporen	gerade od. gebo- gen, keilartig od. Körper ellipsoid	gleich od. 2x der Körper länge, blaß-1,5um dick verjüngt	glatt	5-10 transv., mehrere longit. od. schiefe manchmal an Septen eingeeengt
<i>A. humicola</i>		22,5- 45	olivbraun	18-45 2,25- 10,5	von 5 Sporen	ellipsoid, schna- bellos od. oval mit Schnabel		junq, Stacheln in der Wand	1-8 zellig
<i>A. pluriseptata</i>	bläß braun	67,5	goldbraun bis schwarz	21-62 4,5- 18	keine od. gele- gentlich	ellipsoid od. fast eiförmig	kurz od. fehlt	glatt	2-6 transv. 1-4 longit. od. schiefe



Abbildung 5: Bildung von Septen der *Alternaria (brassicola)* Sporen (CAMPBELL, 1969)



1) Sporenbildung von der Konidiophore

2) Sporenbildung von Sporen, die sich an Hyphen geheftet haben (direkte Sporenbildung)



3) Sporenbildung nach Beendigung des Wachstums einer Spore

Abbildung 6: Sporenbildung (ELLIS, 1971)

Spitzen der Konidiophoren, wodurch sich um die dabei entstandene Pore nachträglich ein sog. Annulus bildet, oder aus Sporen (JOLY, 1964). Die Mutterspore verfügt bevor sie Sporen bildet, normalerweise über eine bis mehrere Septen und eine sekundäre Wand. Eine Pore wird von der primären Wand gebildet, die sekundäre Wand wächst aus ihr heraus, um die primäre Wand der neuen Spore zu bilden.

Die Bildung erfolgt aus Sporen, die sich den Hyphen angeheftet haben und damit die erste Spore in der Kette bilden. Nachdem das Wachstum von Sporen beendet ist, kann die Bildung neuer Sporen nach Entwicklung eines neuen Wachstumspunktes an einer der lateralen Zellen erfolgen. Dabei wird eine kleine Konidiophore gebildet, die durch ein Septum von der Spore getrennt ist. Auch die apikale Zelle kann zuerst eine Konidiophore bilden und braucht nicht direkt eine Spore zu produzieren. Diese Art von Konidiophorenbildung scheint sich auf eine weitere Region der Sporenwand auszubreiten und nicht nur auf die Pore, wie es bei der direkten Sporenbildung der Fall ist (CAMPBELL, 1969). (vgl. Abbildung 6)

3.3 Vorkommen

Alternarien kommen in der freien Natur weit verbreitet vor. Man findet sie sowohl in der Luft als auch im Boden. Viele Spezies sind pflanzenpathogen und schädigen die Feldfrüchte bereits vor der Ernte (Feldpilze) oder sie verursachen Verderb nach der Ernte. Da Alternarien sogar bei niedrigen Temperaturen noch gut wachsen, sind sie auch am Verderb von eingefrorenen Früchten und Gemüse beteiligt (STINSON et.al., 1980). Von REIß (1981) wird berichtet, daß Alternarien häufig in Brot zu finden sind und LEISTNER und AYERS (1967) beschreiben das Vorkommen der Pilze in Fleischerzeugnissen.

MAGAN und LACEY (1985) stellten fest, daß das Wachstum der Alternarien auf Agar oft von anderen Pilzen kompetitiv gehemmt wird, dagegen waren sie im Getreide nach 4-wöchiger Aufbewahrung bis zu 50% vertreten.

MULINGE und CHESTERS (1970) berichten, daß bei Hafer Alternarien, Cladosporien und Fusarien mehr in den Hülsen vorkamen als in der Karyopsis. Das gleiche Bild ergab sich bei Weizen (FLANNIGAN, 1974).

PEPELJNAK und CVETNIC (1984) untersuchten 3700 Proben (Mais, Weizen, Bohnen) in Osteuropa, und zeigten auf, daß von den Feldpilzen Alternarien (35,1-39,4%) und Fusarien (34,5-38,3%) sowie von den Lagerungspilzen Absidia (12-14%), Mucor (7-10,2%), Rhizopus (43,7-49,7%), Trichoderma (18,3-23,7%) und Trichothecien (4,3-4,8%) am häufigsten nachzuweisen waren.

ABDEL-HAFEZ (1984) berichtet, daß u.a. Alternarien (Hafer, Mais, Sorghum, Weizen) zu den häufigsten Genera in 10 untersuchten Proben Ägyptens gehörten. Er stellte drei verschiedene Alternaria Species fest, *Alt. alternata*, *Alt. chlamydospora* und *Alt. grisea*, von denen erstere häufiger isoliert wurde als die beiden anderen.

Einige Alternaria-Species zeigen Wirtsspezifität, z.B. *Alternaria citrii*. Sie wächst nur auf Zitrusfrüchten. *Alternaria solani*, die nur Solanaceen befällt, gedeiht dagegen auch auf anderen Wirten.

Das Vorkommen von Alternarien auf einer Vielzahl von Früchten und Gemüsearten, durch die große Mannigfaltigkeit im Wachstum auf verschiedenen Substraten und ihre Anreicherung unter den heutigen

Lagerungsbedingungen läßt vermuten, daß *Alternaria* ebenso wie die bereits besser untersuchten Genera *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* die Gesundheit von Mensch und Tier gefährden können (STINSON et.al., 1980).

Toxische *Alternaria*-Stämme wurden im überwinterten Getreide, das im Jahre 1944 den Ausbruch der alimentären toxischen Aleukie (ATA) in der U.d.S.S.R. verursachte, gefunden. Obwohl es anzunehmen ist, daß im Wesentlichen das von *Fusarien* gebildete T-2 Toxin für den Ausbruch der ATA verantwortlich zu machen ist, verdient Beachtung, daß zwischen toxischen Stämmen von *Alternaria tenuis* und *Fusarien* (JOFFE, 1964) ein synergistisches Wirkungsprinzip in der Toxizität gegenüber Versuchstieren beobachtet wurde (STINSON et.al., 1980).

3.4 Krankheiten mit Beteiligung von *Alternaria* spp.

DOUPNIK und SOBERS (1968) untersuchten 96 aus Tabak isolierte und auf Getreide kultivierte *Alternaria longipes*-Stämme auf Toxizität im Fütterungsversuch an Hühnerküken. Der 14-tägige Versuch mit kontaminiertem Getreide führte zum Verenden der Tiere nach Verabreichung von 31 der 96 Isolate, 12 Isolate ergaben ein verzögertes Wachstum der Tiere und bei 53 Isolaten waren an den Tieren keine klinischen Erscheinungen wahrnehmbar. Bevor der Tod nach 4-8 Tagen eintrat, waren bei den Tieren klinische Symptome nachweisbar (DOUPNIK und SOBERS, 1968; vgl. Tabelle 32).

Bewachsene Kulturmedien zweier *Alternaria*-Isolate, die Tenuazonsäure und Alternatoxin-I synthetisierten, riefen Intoxikationsercheinungen hervor und waren lethal für Hühner und Ratten (vgl. später). Anreicherungen anderer Isolate (2), die Alternariolmonomethyläther, Alternariol und Alternen in verschiedenen Mengen produzierten, verursachten bei oraler Applikation keine schädlichen Wirkungen, obwohl die Mengen an verdächtigen Metaboliten der Pilze in den zu 50% kontaminierten Getreide-Reis Rationen ca. 6x größer waren, als diejenigen in den kontaminierten Sorghumproben zu finden waren (SEITZ et. al., 1975; SAUER et. al., 1978).

Hühner, die Futter mit Tenuazonsäure und Alternatoxin-I bildenden *Alternaria alternata*-Stämmen (2) (kontaminierte Getreide-Reis-

Tabelle 32: Symptomatik der Intoxikation infolge der Aufnahme mit Alternarien verpilzter Futtermittel beim Geflügel (bisherigen Beobachtungen).

Kuken Fütterungsversuch (14 Tage, Alt longipes)	Klinik	Verminderter Appetit Lethargie Diarrhoe Verlust von muskulärer Kontrolle Koma → Tod	Referenzen DOUPNIK u SOBERS, 1968
Hühner * Fütterungsversuch (TeA-u. ATX-I-Bildner)	Klinik Patho- logie	Schwachheit an den Beinen, steifer Gang, Hängenlassen der Flü- gel, Teilnahmslosigkeit evtl. Tod in einer Wo- che Blutungen im Isthmus Muskelmagen, Erosio- nen, Nekrosen, Hämor- rhagien unter der Schleimhaut; evtl. Vor- magenverletzungen	SAUER et al., 1978
Poultry hemorrhagic Syndrom	Klinik Patho- logie	Blutiger Diarrhoe blasse Kopflappen Hämorrhagien Nieren-, Leber-, Knochenmarksläsionen	CULVENOR et al., 1974

* Abkürzungen vgl. Tabelle 38.

mischung; 10% der Ration) erhalten hatten, zeigten unabhängig vom verabreichten Alternariastamm keine Anzeichen einer Intoxikation, auch dann nicht, wenn der Anteil 50% der Ration ausmachte. Fütterungsversuche mit einem anderen, Tenuazonensäure und Alternatoxin-I produzierenden Stamm (FN-8442-5), führte am dritten Tag zum Tod eines Vogels, am vierten Tag verendeten zwei weitere Versuchstiere. Zu diesem Zeitpunkt kam es zu klinischen Symptomen, obwohl die Vögel fraßen und an Gewicht zunahmen (SAUER et. al., 1978) (vgl. Tabelle 32). Eine pathologisch-anatomische Untersuchung der Vögel, die in der ersten Woche starben sowie auch der Vögel, die die 3. Woche überstanden hatten, zeigten Verletzungen am Isthmus und Muskelmagen. Derartige pathologisch-anatomische Befunde waren auf Verabreichung von Stämmen, die nur Alternariolmonomethyläther, Alternariol und Alternatoxin produzierten nicht festzustellen (SAUER et. al., 1978).

Das Hämorrhagische Syndrom des Geflügels ist eine bei Broilerküken stark verbreitete, in den USA seit den 1950-er Jahren bekannte Krankheit, die auf verschimmeltes Futter zurückzuführen sein soll. In einem Fall der Kontamination des Futters mit Aspergillen, Penicillien, Alternarien und Paecilomyces zeichneten sich im Experiment die Schwärzepilze im Vergleich zu den anderen am Befall beteiligten Pilzen durch eine höhere Toxizität aus (FORGACS und CARLL, 1962) (vgl. Tabelle 32).

Die Aufnahme von verschimmeltem Futter verursachte bis zu 40% Mortalität in einigen Geflügelfarmen (FORGACS et.al., 1962); es hatte den Anschein, als ob sich *Aspergillus flavus* in der Hauptsache dafür verantwortlich zeichnete, es wurden aber auch toxische Stämme von *Alternaria* aus dem Futter isoliert.

Bei der Überprüfung der Toxizität von Stämmen, die keine Tenuazonsäure, aber Alternariolmonomethyläther, Alternariol und Altenuen bildeten, wurden im Fütterungsversuch an Ratten keine Veränderungen festgestellt, wenn 10 bzw. 50% kontaminierte Getreide-Reismischung eingesetzt wurde (SAUER et.al., 1978).

Von zwei 10%-Rationen unterschiedlicher Stämme, die beide Tenuazonsäure und Altertoxin-I produzierten, wurde eine normal, die andere kaum angenommen. Ratten, die Futter mit dem Stamm HRS-5 (10%) aufgenommen hatten, zeigten Hyperaktivität und besaßen nach 3 Wochen ein geringeres Gewicht als alle anderen, mit 10%-Rationen gefütterten Tiere. Makroskopische pathologisch-anatomische Veränderungen waren nicht augenfällig.

50%-Rationen, kontaminiert mit den Tenuazonsäure und Altertoxin-I produzierenden Stämmen, wurden schlecht gefressen. Nach einer Woche war ein hoher Gewichtsverlust zu verzeichnen und keine der mit HRS-5 Stämmen gefütterten Ratten überlebte und nur eines der mit FN-8442-5 gefütterten Tiere überlebte die 21-tägige Versuchsperiode (vgl. Tabelle 33).

Tabelle 33: Ergebnisse von Fütterungsversuchen von Alternariotoxinen an Ratten.

Fütterungsversuch * (TeA- und ATX-I-Bildner)	Klinik		SAUER et.al. 1978
	10% Ration	Hyperaktivität nach 3 Wo; Gewichtsverlust	
	50% Ration	spärlich gefressen Gewichtsverlust (1Wo)	
	Pathologie	→ Tod Hämorrhagien im Magen-Darmbereich	

* Abkürzungen vgl. Tabelle 38.

Nach SMITH et.al. (1968) beträgt die LD₅₀-Dosis des Na-Salzes der Tenuazonssäure für weibliche Ratten 168 mg/kg/KGW und für männliche 180 mg/kg/KGW (oral). GITTERMANN (1965) bestimmte die LD₅₀-Dosis der Tenuazonssäure für Ratten mit 81 mg/kg.

Isolate von Alternarien von Tabak, die in Kultur gewachsen waren, bildeten Substanzen, die nach oraler Gabe für Mäuse toxisch waren, der Rauch von mit diesen Pilzen kontaminierten Heues verursachte Karzinome und Emphyseme bei Mäusen, wobei der Rauch von normalem Heu nur chronische Entzündung verursachte (FORGACS und CARLL, 1966). (vgl. Tabelle 34)

Dreiundfünfzig der sechzig (90%) Alternaria-Stämme die aus Futtergetreide gezüchtet worden waren, und 12 von 23 aus Erdnüssen isolierte Stämme, waren im Fütterungsversuch lethal für Mäuse, wenn sie auf Getreide-Reis-Substrat kultiviert worden waren (CHRISTENSEN et.al., 1968; PERO et al., 1873). (vergl. auch 3.5.1 und Tabelle 34)

Tabelle 34: Versuche mit Mäusen (Alternariatoxine)

Rauch von Kontaminiertem Heu nicht Kontaminiertes Heu	Pathologie	Karzinome Emphyseme chronische Entzündung	FORGACS u. CARLL, 1966
AOH+AME i.p. *	Klinik	in einigen Minuten ruhig, evtl. Normalisierung in in 24 Std.; Augen: glanzlos; evtl. Magenspasmen erschwerter, unregelmäßiger Atem	Pero et.al., 1973
AOH+AME s.c.	Klinik	Gewichtsabnahme	
AOH+AME 25:25mg/kg tragende Mäuse am 9-12 Tag	Pathologie	Tote ↑ resorbierte ↑ verkümmerte ↑ Föten	
AOH (100mg/kg, s.c.) tragende Mäuse am 9-12 Tag	Pathologie	Tote ↑ resorbierte ↑ verkümmerte ↑ Föten	
AOH, am 13-16 Tag	Pathologie	Mißbildungen ↑	
Altertoxin (200mg/kg)	Klinik Pathologie	Inaktivität → Tod subendokardiale u. sub- arachnoidale Hämorrhagien u. Blut in Gehirn- ventrikeln	

* Abkürzungen vgl. Tabelle 38.

Onyalai, eine oft bei der schwarzafrikanischen Bevölkerung vorkommende Krankheit des Blutes, wird durch Tenuazonensäure-Salze (Mg, Ca) im Getreide verursacht, für deren Bildung hauptsächlich *Phoma sorghina* verantwortlich gemacht wird (STEYN und RABIE, 1976). (vgl. Tabelle 35)

Tabelle 35: Krankheiten bei Menschen, die durch *Alternaria*-Toxine od. von anderen Pilzen gebildeten gleichen Toxinen verursacht werden.

Onyalai Salze der Tenuazonensäure	Klinik	Hautblutungen Mund: hämorrhagische Bläschen	STEYN u. RABIE, 1976
Allergien	Klinik	Rhinitis, evtl. auch unterer Respirationstrakt beteiligt	WRIGHT u. DERRICK, 1975 COMSTOCK et.al. 1974
Mykosen	Klinik	mehrere nicht heilende Ulzera mit trockenen Krusten	PEDERSEN, 1976
	Klinik	erythematöse bis 1cm große Macula → Papeln mit nabelförmigen ulzerösen Zentren, umgeben von erythematösen Arealen	FARMER et.al., 1976

IRFAN et.al. (1980) erzeugten durch 20-tägige Verabreichung von künstlich mit verschiedenen Kombinationen von Pilzen aus Feldabfällen infiziertem Reisstroh (3 Tiere: *Mucor hiemalis*, *Fusarium avenaceum*, *Alternaria alternata*, *Penicillium notatum* und *Cladosporium cladosporioides*; 3 Tiere: *Cladosporium cladosporioides* und *Penicillium notatum*) bei verschiedenen altrigen und geschlechtlichen Büffeln und Kühen die in den Reisanbaugebieten bekannte Deg Nala-Krankheit (vgl. Tabelle 36).

Sie hatten drei Jahre lang alle bekannt gewordenen Fälle des Auftretens dieser Krankheit (338 erkrankte Tiere, davon 301 Büffel und 37 Kühe/Bullen) näher studiert. Bei diesen Untersuchungen wurden 21 Pilzspezies erfaßt, unter denen Fusarien, Cladosporien, Alternarien, Aspergillen, Penicillien, Nigrospora und *Mucor* dominierten.

Tabelle 36: Symptome der durch Zusammenwirken mehrerer Pilze, darunter Alternarien, verursachten Deg Nala Krankheit.

Deg Nala Krankheit	Klinik	Allgemeinbefinden gestört Schwachheit, Abmagerung; Schwanz, Ohren, Maul, Zunge: gangranöse Verletzungen → Verwerfen dieser Stellen → Genesung; Hautverletzungen, fortgeschrittene Fälle: Klauenablösung	IRFAN et.al., 1980
--------------------	--------	--	-----------------------

Alternarien gehören unabhängig davon durch ihr Vorkommen in der Luft und im Hausstaub zu den Ursachen von Allergien. Eine Untersuchung von Hausstaub in Häusern Dänemarks ergab, daß nach *Mucorales Penicillium*-, *Alternaria*-, *Cladosporium*- und *Aspergillus*-Arten zu den dominierenden Spezies zählen (GRAVESEN, 1978). Empfindliche Patienten zeigten Symptome, sobald die Sporenkonzentration der *Cladosporien* in der Luft über $3000/m^3$ und der *Alternarien* über $100/m^3$ anstieg (GRAVESEN, 1978).

WRIGHT und DERRICK (1975) testeten 26 Allergene an 100 erwachsenen Asthmatikern in Brisbane. Sieben der Patienten reagierten auf Alternarien. Sechs von ihnen litten sowohl an Rhinitis als auch an Asthma. Da die *Alternaria*-Sporen relativ groß sind, sind sie hauptsächlich in der Nase anzutreffen. Sie verursachen deshalb vermutlich eher Rhinitis als Asthma. In der Brisbaner Luft war hauptsächlich *Alternaria tenuis* anzutreffen (REES, 1964).

Nach GEDEK (1980) werden die Sporen von Pilzen durch das Flimmerepithel der Atemwege zurückgehalten, wenn ihr Durchmesser mehr als 10 μm beträgt.

COMSTOCK et.al. (1974) isolierten Pilze aus dem Sputum von Männern. Dabei machten Alternarien 10% aus. Es wurde angenommen, daß diese Pilze hauptsächlich aus dem unteren Respirationstrakt stammten, da ihre Isolierung größtenteils aus Proben gelang, die mucoide oder mukopurulente Beschaffenheit zeigten und ein Nasenkatarrh nicht vorgelegen hatte.

YU (1965) berichtet, daß Alternarien im Vorkommen auf der normalen menschlichen Haut an achter Stelle stehen (97 von 3584 Isolatzen).

BOTTICHER (1966) fand heraus, daß *Alternaria* spp. 15% von allen Pilzen, die in Proben aus superfiziellen mykotischen Läsionen gefunden wurden, ausmachten. Jedoch waren *Alternarien* nur selten allein im Probenmaterial nachweisbar. Es gibt auch einige Berichte über Hautinfektionen des Menschen, die *Alternarien* verursacht haben sollen. In diesen Fällen waren entweder die Extremitäten (Arme, Hände, Nägel, Füße), oder der Gesichtsbereich (Backe, Nase, oder Kopfhaut) von *Alternarien* befallen. Auch über durch *Alternaria*-Arten verursachte Keratomykosen wird in der Literatur berichtet (AZAR et. al., 1975). (vgl. Tabelle 35)

Alternarien sollen auch Mykosen bei Tieren verursachen. DOVGICH (1962) isolierte *Alternarien* von Hunden mit Hautekzemen und konnte mit *Alt. tenuis* nach Inokulation die Bildung charakteristischer Ekzeme herbeiführen.

REDDY et. al., (1974) untersuchten die pathogenetische Bedeutung von *Alt. alternata* bei Kaninchen und Meerschweinchen. Sobald die Verabreichung einer Hyphen und Sporen enthaltenden Suspension an der Haut (8×10^4 Partikel/ml) nach Scarification durchgeführt wurde, entwickelten sich superfizielle Läsionen in der Haut. Die Läsionen waren ekzematös mit peripheraler Ausdehnung. Frühere Arbeiten (ENGLISH, 1965) zeigten, daß Hyphen von *Alternaria* spp. die Kortex der Haare, Nägel und Schwielen (callus) aufspalten können.

REDDY et.al., (1974) vertreten die Auffassung, daß *Alternarien* superfizielle Mykosen verursachen können. Die Läsionen waren bei Kaninchen stärker ausgeprägt und von größerer Ausdehnung als bei Meerschweinchen (vgl. Tabelle 37).

Nach intradermaler Injektion einer *Alternaria*-Sporensuspension kam es zur Bildung roter, papelähnlicher Schwellungen bis hin zu kleinen Abszessen (vgl. Tabelle 37).

Nach i.p.-Verabreichung wirkte die *Alternaria*-Sporensuspension nicht krankheitserregend, es wurden aber Antikörper gegenüber *Alternaria alternata* produziert.

Eine Wirkung ist auch gegenüber Pflanzen zu verzeichnen. *Alternaria tenuis* gehört zu den Rhizospherpilzen und hemmt das Pflanzenwachstum. In Vergesellschaftung mit anderen Rhizospherpilzen wird die Hemmung allerdings aufgehoben (DAVIDSON, 1974).

Tabelle 37: Klinische Symptome nach künstlicher Infektion bei verschiedenen Tierarten.

Tierarten	Symptome	Referenzen
Hund	Ekzeme	DOGYICH et.al., 1962
Meerschweinchen mit Skarifikation	4 Tage lang erythematös → trocken, schuppig od. naß krustig wenig Haarwachstum in den Bereichen	REDDY et.al., 1974
i.d. (Inokulum in 1 Tag absorbiert)	rote papelähnliche Schwellung der 2 Wo persistiert; Haut an Injektionsstelle: trocken, schuppig; kein Haarwachstum an der Stelle	
Kaninchen	wie bei Meerschweinchen, nach Skarifikation mehr entzündlich	

Schwarzfleckenkrankheit der japanischen Birne, Braunfleckenkrankheit von Tabak, frühes Erblassen von Tomaten und Kartoffeln und Sämlingschlorosis von Zitrusfrüchten werden von Alternarien verursacht (PERO et.al., 1973).

Tentoxin verursacht Chlorose bei Bohnen und Kopfsalat und hemmt das Grünwerden von in Dunkelheit gebleichten Kopfsalatsämlingen (SCHADLER et.al., 1976).

3.5 Alternariatoxine

Nach HARVÄN und PERÖ (1976) sind insgesamt 27 verschiedene *Alternaria*-Toxine existent. Davon sind viele in bezug auf Wirkung und Struktur noch nicht aufgeklärt. Als einige der wichtigsten Dibenzo-a-pyrone gelten Alternariol (AOH), Alternariolmonomethyläther (AME), Alternuol (ALT), Alternuisol (AOL). Daneben werden noch Tentoxin, Tenuzonsäure (TeA) und die zwei, der Struktur nach nicht erfaßten Verbindungen Altertoxin-I (ATX-I) und Altertoxin-II (ATX-II) aufgrund ihrer Toxizität für Mehrzeller als wichtig angesehen (vgl. Tabelle 38).

Nach Untersuchungen von BURROUGHS et. al. (1976) kann als bestes Substrat für Alternariametabolitbildung sterilisierter, gemahlener Reis mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 35% angesehen werden.

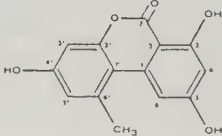
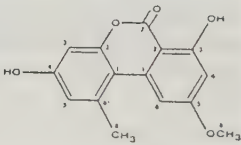
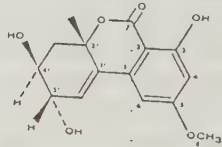
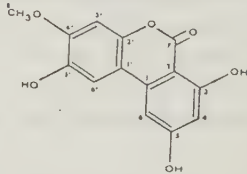
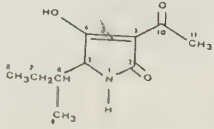
Nach BRÜCKNER et. al. (1983) hemmt ein zu hoher Phosphatgehalt im Nährmedium die Tentoxinbildung. Dabei war exogener Phosphatmangel nicht der auslösende Faktor für die Produktion, sondern dieser übte einen Einfluß auf die Menge des gebildeten Tentoxins aus.

Nach HAGGBLOM (1981) bildeten viel Toxin produzierende *A. alternata* Stämme nur wenig braun-gelbliches Luftmyzel und dies auch erst in sieben Tagen. Die weniger toxischen Stämme entwickelten dagegen viel wolliges, mehr graues Myzel innerhalb von 2 Tagen.

Weißes und blaues Licht hemmten die Alternariol- und Alternariolmonomethyläther-Bildung von *A. alternata* in Czapek liquid Medium (SÖDERHALL et. al., 1978; HAGGBLOM, 1979).

Die Untersuchungen von MERONUCK et. al. (1972) ergaben, daß 20 von 23 aus Getreide, Samen und anderem pflanzlichen Material isolierte toxische Alternariaisolate, die für Ratten lethal waren, Tenuazonsäure-Bildner waren. Die Untersuchungen von SAUER et. al. (1978) (vgl. 3.4) bestätigen, daß dieses Toxin der Alternarien für die Lethalität zweifelslos verantwortlich gemacht werden kann. Es darf dabei aber nicht übersehen werden, daß Altertoxin-I dabei auch Bedeutung zukommt.

Tabelle 38: Gegenüberstellung einiger Metabolite von Alternarien
(COLE u. COX, 1981)

Alternariol AOH	$C_{14}H_{10}O_5$	258.0528	
Alternariol monomethyl ether AME	$C_{15}H_{12}O_5$	272.0684	
Altenuene ALT	$C_{15}H_{16}O_6$	292.0946	
Altenuisol AOL	$C_{14}H_{10}O_6$	274.0476	
Altertoxin I*	$C_{20}H_{16}O_6$	352.0946	
Altertoxin II*	$C_{20}H_{14}O_6$	350.0790	
Tenuazonic acid TeA	$C_{10}H_{16}O_3N$		

3.6 Nachweisverfahren

Zur Identifizierung der Alternaria-Toxine werden hauptsächlich dünnsschichtchromatographische, hochdruckflüssigkeitschromatographische und gaschromatographische Verfahren herangezogen (WITTKOWSKI, 1984).

Einige der Alternaria-Metabolite üben auch eine toxische Wirkung auf biologische Testsysteme aus, so daß auch diese dazu geeignet sind.

GRIFFIN et. al. (1983) untersuchten die Wirkung von Alternariol, Alternariolmonomethyläther, Altenuen und Tenuazonsäure auf 7 Tage alte Hühnerembryonen. Alternariol, Alternariolmonomethyläther und Altenuen verursachten keine Mortalität und zeigten keine teratogene Wirkung (1000ug/Ei). Tenuazonsäure dagegen wirkte lethal (548 ug/Ei) und erwies sich als teratogen.

PERO et.al. (1973) beschäftigten sich mit der Toxizität von Alternaria-Metaboliten gegenüber Bacillus mycoides, HeLa-Zellen, weiblichen Mäusen und Mäuseföten. Es wurden Roh-Extrakte, gereinigte Toxine und die Kombination aus den 2 Komponenten Alternariol und Alternariolmonomethyläther in der Toxizität miteinander verglichen.

Altertoxin-II war besonders toxisch für HeLa-Zellen. Alternariol und Altenuisol erwiesen sich vor allem als toxisch gegenüber Bacillus mycoides, wobei sich bei Alternariolmonomethyläther und Alternariol (0,25ug:0,25ug) ein synergistischer Effekt zu erkennen gab (vgl. Tabelle 39).

Bei gerade ausgewachsenen weiblichen Mäusen kam es nach i.p Injektion von Alternariol und Alternariolmonomethyläther zu klinischen Symptomen und zum Tod der Tiere (vgl. Tabelle 40).

Auch die Zahl der toten und resorbierten Föten und Mißbildungen wurde beeinflusst, wobei diese Veränderungen durch Alternariol oder mit Alternariol und Alternariolmonomethyläther zu beobachten waren, bei alleiniger Gabe von Alternariolmonomethyläther aber keine Signifikanz zeigten (vgl. Tabelle 34).

DIENER et. al. (1976) berichten, daß Alt. alternata-Isolate toxisch für Brine shrimps, Hühnerembryonen und Ratten sein können.

Tabelle 39: Konzentrationen der Alternaria-Toxine, die eine Wirkung gegenüber HeLa-Zellen oder *Bacillus mycoides* ausuben.

Toxin ●	ID ₅₀ HeLa-Zellen ug/ml	ID ₅₀ Bacillus mycoides Wachstumshemmung ug/Disk
AOH	¹⁾ 6 ²⁾ 6	²⁾ 60
AME	¹⁾ 8 ²⁾ 8-14	²⁾ 500
ALT	²⁾ 28*	²⁾ 125
AOL	²⁾ 8	²⁾ 5
AOH+ AME	²⁾ 7-10	²⁾ 0,25
ATX-I	²⁾ 20	²⁾ 250
ATX-II	²⁾ 0,5	²⁾ 250
TeA	²⁾ 40-90	

¹⁾ SPALDING et.al., 1970

● Abkürzungen vgl. Tabelle 38

²⁾ PERO et.al., 1973

● Die niedrigste Konzentration des Toxins die eine meßbare Hemmzone verursachte

*ID₂₅

Tabelle 40: Mäuseletalität nach Applikation unterschiedlicher Mengen von Alternaria-Toxinen (PERO et.al., 1973)

Toxin ●	Menge mg/kg	Lethalität Anzahl der Tiere
AOH	100	2/10
	200	3/10
	400	3/10
AME	100	0/10
	200	0/10
	400	1/10
AOH+ AME *	100+ 100	3/10
ALT	50	1/3
ATX-I	100	0/8
	200	8/8
ATX-II	100	0/2
	200	2/2

● Abkürzungen vgl. Tabelle 38.

(* Kein Synergismus AOH+AME vgl. *Bacillus mycoides*)

Bei Untersuchungen der Wirkung von Alternariolmonomethyläther im Test mit Larven vom Zebrafisch (Brachidanio rerio) zeigte sich, daß dieses Toxin noch bei Konzentrationen von 1,2 mg/l für das Testobjekt toxisch ist (BRESCH und FRANK, 1985).

4. GENUS TRICHOOTHECIUM

4.1 Arten

RIFAI und COOKE (1966) unterschieden Trichothecien taxonomisch und beschrieben vier verschiedene Species. Danach umfaßt die Gattung *Trichothecium* LINK ex. Fr., welche ein sehr heterogenes Genus darstellt, die Arten *Trichothecium roseum* (PERS.) LINK. ex. S.F. GRAY), *Trichothecium luteum* (zit. PETCH, 1917), *Trichothecium parvum* RIFAI sp.nov. und ein imperfektes Stadium eines *Trichothecoides* (zit. TUBAKI, 1960). Andere früher als *Trichothecium* benannte Pilze sind in den Genera *Genicularia*, *Candelabrella* und *Arthrobotrys* zu finden.

Aus der Tabelle 41 gehen die Synonyme der Art *Trichothecium roseum* hervor, die in der Literatur häufig benutzt worden sind (zit. RIFAI und COOKE, 1966).

Tabelle 41: Synonyme des *Trichothecium roseum*.

<i>Trichothecium roseum</i> (PERS.) LINK ex S.F. GRAY, Nat. arrang. Brit. Pl. 1. 550. 1821. (PERS.) LINK in Mag. Ges. naturf. Freunde, Berl. 3, 18, 1809.
= <i>Trichoderma roseum</i> PERS., in Römer's Neues Mag Bot. 1, 92, 1794
= <i>Hyphelia rosea</i> (PERS. ex S.F. GRAY) FR., Syst. Orb. Yeg., 149, 1825
= <i>Puccinia rosea</i> (PERS. ex S.F. GRAY) CORDA, Icon. Fung. I, 6, 1837
= <i>Dactylium roseum</i> (Pers. ex S.F. GRAY) Berk. in Ann. Mag. Nat. Hist. 1, 6, 437, 1841.
= <i>Trichoderma rosea</i> (Pers. ex S.F. GRAY) O. KUNTZE, Rev. Gen. Pl. 3 (3), 537, 1898.
= ? <i>Cephalothecium roseum</i> CORDA, Icon. Fung. 2, 14, 1838.

4.2 Mykologische Daten

Trichothecien sind sehr schnell wachsende Pilze, die z.B. auf Sabouraud-Glucose-Agar und Malzextrakt-Agar innerhalb von 2 Tagen Kolonien entwickeln (30 °C) (BETINA und VANKOVA, 1977).

Nach RIFAI und COOKE (1966) unterscheiden sich *Trichothecium roseum*, *T. luteum* und *T. parvum* hauptsächlich durch die andersartige Farbe ihrer Kolonien (*T. roseum*, rosa; *T. luteum*, schmutzig gelb, blaß orange-gelb oder cremefarbig; *T. parvum*, weißlich bis gelblich-grau) und der Größe ihrer Konidien. Das *Trichothecium*-Stadium von *Trichothecoides* unterscheidet sich von den anderen eigentlichen *Trichothecien* durch die mehr oder weniger zylindrischen Konidien und den verzweigten Konidiophoren. Über die Größe der Konidien sind Angaben in der Tabelle 42 enthalten.

Tabelle 42: Größe der Konidien von *Trichothecium*-Arten nach RIFAI und COOKE (1966).

Art	Konidiengröße μ^2		Referenzen
	Grenzwert	Grenzwert	
<i>Trichothecium roseum</i>	112,5-	144-236	RIFAI u. COOKE, 1966
		96-180	LINDAU, 1907 *
		84-220	TUBAKI, 1954 *
<i>Trichothecium luteum</i>	144-	210-305	RIFAI u. COOKE, 1966
	112-	160-220	BOEDIJN, 1929 *
<i>Trichothecium parvum</i>	74-	86-139	RIFAI, sp.nov., 1966
<i>Trichothecium</i> -Stadium von <i>Trichothecoides</i>		30-138 21-126	HANLIN, 1964 *

* zit. RIFAI und COOKE, 1966

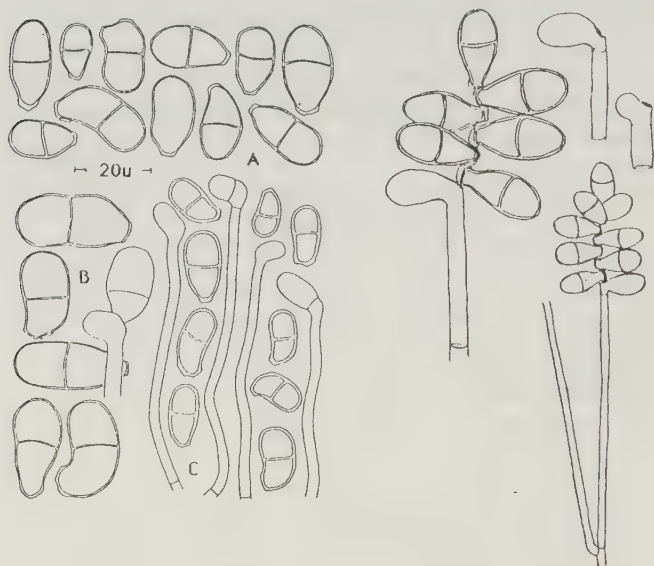
Nach BARRON (1968) kommen die Konidiophoren (Typspecies *Trichothecium roseum*) einzeln oder in Gruppen vor, sind normalerweise gerade oder leicht gebogen, hyalin, 100-250 μ m lang und in der unteren/Hälfte spärlich septiert. Im reifen Zustand sind sie mehr oder weniger zylindrisch geformt und leicht angerauht durch winzige Körnchen (BARRON, 1968).

Die konidiogene Zelle der Konidiophore ist hyphenähnlich, gerade und zylindrisch (BARRON, 1968).

Die Sporen sind relativ groß (12-18x8-10 μ m; vgl. Tabelle 42) und in zwei Zellen geteilt, wobei die obere Zelle ein wenig größer ist (BARRON, 1968).

Die erste gebildete Spore ist eine Gangliospor, die in basipetaler Reihenfolge von der Konidiophore gebildet wird. Auch die nachfolgenden Konidien könnten als Gangliosporen interpretiert werden, da ein Teil der Konidiophore dem Körper der Spore einverleibt ist (SUBRAMANIAN, 1972).

Die basipetale Folge der Konidienketten wird nicht als echte Kette angesehen, sondern als eine lineare Serie oder falsche Kette interpretiert, da es keine Kontinuität zwischen den Wänden zweier Sporen gibt (SUBRAMANIAN, 1972). (vgl. Abbildung 7)



Trichothecium-Konidien

A: *Trichothecium roseum*

B: *Trichothecium luteum*

C: *Trichothecium parvum*

(RIFAI und COOKE, 1966)

'Sporenketten-
bildung'
(BARRON, 1968)

Abbildung 7: Konidien und 'Kettenbildung' bei *Trichothecium*.

4.3 Vorkommen

Trichothecien kommen ubiquitär und auf der Erdoberfläche überall vor. Sie sind u.a. von Böden (BARRON, 1968), Luft und Hausstaub (TOMSIKOVA und NOVACKOVA, 1970), Früchten (BETINA und VANKOVA, 1977), Getreide (SCOTT, 1965; COADY, 1975), Hirse (COADY, 1975), Erdnüssen (HOLZAPFEL und STEYN, 1968) isoliert worden.

4.4 Mykotoxikosen unter Beteiligung von Trichothecien

FREEMAN (1955) injizierte 0,1 ml einer Trichotheciensuspension (100 mg/ml) Ratten, die nach 1,5 Stunden die folgenden Symptome zeigten: Diarrhoe, übermäßiger Harndrang und Tod in 16 Stunden. SCOTT (1964) fütterte Enten (14 Tage) u.a. mit Trichothecium infiziertem Maismehl, das mit anderem Futter vermischt war (1:3). Alle drei Versuchstiere starben bei Aufnahme des einen von ihm isolierten Trichotheciumstammes. Dieser toxische Stamm (1:1 Vermischung) wurde dann an Mäuse und Ratten verfüttert, die aber keine Lethalität zeigten. Stattdessen kam es bei den Ratten und Mäusen zum schnelleren Wachstum.

RICHTER (1975) untersuchte 580 Futterproben einer Besamungsstation und wies nach, daß das Futter nicht mehr als 300 Sporen von Schimmelpilzen und 318 für Hefen /g im Durchschnitt/Probe/Monat (24 Proben) enthielt, was gegen Futtermittelverderb spricht (GEDEK, 1973). Nur im Falle verschimmelter Futterproben kam es zum Auftauchen dieser Pilze im Sperma (3656 Proben), die dann auch im Futter nachzuweisen waren. Bei Beginn der Untersuchungen (September) waren Trichothecien vermehrt im Futter nachweisbar, später nicht mehr.

Die "Mouldy corn toxicosis" ist einer der komplexesten Mykotoxikosen. Die Noxen, die zu dieser Toxikose führen, sind bislang erst unvollständig erforscht, denn bei jedem Ausbruch waren verschiedene Pilze und Toxine nachweisbar. MARASAS und SMALLEY (1977) isolierten 42 verschiedene Pilze und Actinomyceten von Maismehl, welches die Krankheit verursachte. Darunter befand sich ein Trichothecium roseum Stamm, der nach Kultivierung auf Mais-

mehl (69% der Normalration) in einem 14-tägigen Fütterungsversuch bei Hühnern und Ratten eine 90-100% Mortalität ergab.

4.5 Trichotheciumtoxine

Es werden Toxine aus drei verschiedenen Stoffklassen (Trichothecene, Rosenane, Roseotoxine) von *Trichothecium roseum* gebildet (vgl. Tabelle 43).

BETINA und VANKOVA (1977) beobachteten auf Sabouraud-Glucose-Agar und auf Malzextrakt-Agar die Bildung von Trichothecin schon ab dem 4. Tag.

Trichothecin ist ein Mykotoxin, welches in vielerlei Hinsicht biologisch aktiv ist. Es wirkt antimykotisch gegen Fungi imperfecti sowie Zygomyceten und Ascomyceten (FREEMAN und MORRISON, 1949), antiviral (BAWDEN und FREEMAN, 1952) und bildet auf mit Trichothecien kontaminierten Früchten eine Bittersubstanz (BETINA und VANKOVA, 1977).

Rosein ist ein antibakteriell wirksamer Metabolit von *Trichothecium* (FREEMAN und MORISON, 1949).

4.6 Nachweisverfahren

FREEMAN (1955) applizierte 5g einer 1% Trichothecinlösung (01) täglich auf rasierte Meerschweinchenhaut. Nach 5-tägiger Applikation kam es zu Rötung und Schmerzen.

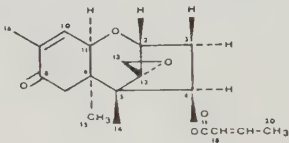
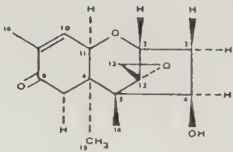
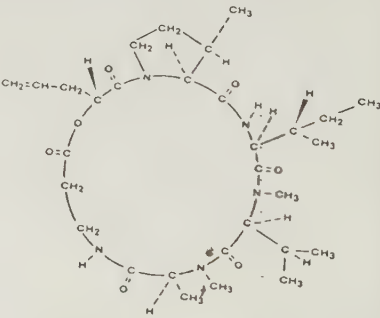
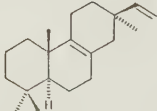
Ein 3-maliges Auftragen auf Kaninchenohr führte zur Rötung der Haut, die später an der Applikationsstelle schuppig wurde.

Nach Auftragen eines Tropfens einer 2%-igen Toxinlösung auf menschliche Kopfhaut kam es zu einer deutlichen Hautreizung.

Das Eingeben von 2 Tropfen 2%-iger Toxinlösung ins Kaninchenauge bewirkte eine leichte Entzündung von Konjunktiven, Nickhaut und des unteren Augenlides.

(Weiteres vgl. Kapitel 2.5 und 2.6.)

Tabelle 43: Metabolite der Arten der Gattung *Trichothecium* (COLE u. COX, 1981; TURNER u. ALDRIDGE, 1983)

Trichothecin $C_{19}H_{24}O_5$ 332.1617	
Trichothecolon $C_{15}H_{20}O_4$ 264.1356	
Roseotoxin B $C_{30}H_{49}O_7N_5$ 591.3615	
Primara-8(9),15-diene	

5. Gattung Scedosporium

5.1 Arten

Eurotiosis gayoni war der erste (SACCARDI und SYDOW, 1899; zit. BARRON, 1968) isolierte Pilz, der zu *Allescheria* gehört. Da dieser nach MALLOCH (1970; zit. BARRON, 1968) mit *Monoascus* übereinstimmt, ist *Allescheria* ein Synonym von *Monoascus* (BARRON, 1968).

SHEAR (1922) beschrieb als erstes *Allescheria boydii*. Wegen der mangelnden Übereinstimmung mit *Monoascus* wurde der Pilz deswegen von MALLOCH (1970) als Vertreter eines neuen Genus angesehen und erhielt den Namen *Petriellidium* (zit. BARRON, 1968).

Es gibt 7 verschiedene Species von *Petriellidium*. *Scedosporium* (*Monosporium apiospermum*) ist ein Anamorph von *Petriellidium boydii* (BARRON, 1968) und kann als dessen imperfekte Form angesehen werden.

5.2 Mykologische Daten

Nach GORDON (1956) ist *Scedosporium* ein schnell wachsender Pilz, der wattige bis wollige, weiße bis gelblich-braune oder grau bis grau-schwarze Kolonien bildet.

Für *Scedosporium* sind die einzelligen, blaß braunen bis dunkelbraunen, glatten, fast runden bis länglichen Sporen charakteristisch. Diese bilden sich aus lateralen Hyphenauswüchsen, von mikronematösen, zugespitzten, zylindrischen Konidiophoren. Die Sporen liegen einzeln oder in Ballen an der Spitze der Konidiophore (BARRON, 1968).

Die gebildeten Cleistothecien der perfekten Form sind kugelförmig, ohne Öffnung, hellbraun bis schwarz und membranös.

Die Asci sind nahezu rund und beinhalten 8 Ascosporen. Die Ascosporen sind eiförmig bis ellipsoid, blaß gelbbraun bis kupferfarben, glatt und besitzen 2 Poren (BARRON, 1968).

5.3 Vorkommen und Bedeutung als Krankheitserreger

Scedosporium (Petriellidium) ist ein Kosmopolit, wird aber häufiger in subtropischen und tropischen Gebieten angetroffen (SCHIEFER und MEHNERT, 1965).

BELL (1975) berichtete, daß Scedosporium in drei Mastbetrieben aus Mistproben am häufigsten isoliert wurde.

Petriellidium verursacht mykotische Aborte bei Tieren, pulmonäre Allescheriose beim Menschen und Myzetome bei Mensch und Tier (BELL, 1975).

PENZENBURG (1958), BRIDGES und BEASLEY (1960; zit. SCHIEFER und MEHNERT, 1965) berichteten über von Scedosporium verursachten Maduromykose beim Hund, und SCHIEFER und MEHNERT (1965) sowie JOHNSON et.al. (1975) beim Pferd.

BENHAM et.al. (1948) und CARL et. al. (1985) diagnostizierten u.a. Gehirnaffektionen durch Scedosporium.

(C) EIGENE UNTERSUCHUNGEN1. Material und Methoden1.1 Art und Herkunft des Probenmaterials

Zur Untersuchung gelangten insgesamt 102 Futtermittelproben, die dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin zur Bestimmung des Keimgehaltes eingesandt worden waren. Nachstehende Tabelle gibt über die Art der untersuchten Futtermittel und deren Anzahl näher Auskunft (Tabelle 44).

**Tabelle 44: Art und Anzahl der untersuchten
Futtermittel (n=102).**

Futtermittel	Probenzahl
Haferkörner	20
Pellets	13
verschiedene Fertigfutter	13
Weizen	10
Gerste	9
Stroh	9
Sojaschrot	4
Silage	3
Heu	2
Getreidemischung	2
Getreideschrotmischung	2
Maisschrot	2
Bierhefe	2
Mehl	2
Haferflocken	1
Weizenkleie	1
Roggen	1
Roggengrieskleie	1
Gerstenschnitzel	1
Eiweißkonzentrat	1
Weißklee	1
Tapioka	1
Gallcuramin	1

Drei Proben 223/85, 225/85 und 226/85 mit makroskopisch sichtbarem Pilzbefall, stammten aus einer Pferdehaltung, in der ohne genauer bekannte Ursache plötzlich einige Pferde verendeten. Die (Probe 223/85) Pellets zeigte einen gelblich-grünen Überzug, welcher von Schimmelpilzen herrührte, die als Aspergillen und Penicillien zu identifizieren waren (vgl. Abbildung 8).



Abbildung 8-10: Pilzwachstum auf Proben 223/85, 225/85 und 226/85.

Die Futterpartikel der Heu-Probe (225/85) wiesen einen schwarzen Belag auf, welcher hauptsächlich von Alternarien und Cladosporien gebildet worden war (vgl. Abbildung 9).

Beim Stroh der Probe 226/85 (vgl. Abbildung 10) handelte es sich um schwarze, leicht entfernbare Pilzlagen, die staubtrocken waren und bei Berührung leicht an den Händen hängen blieben. Wie sich später nach Anfertigung eines Laktophenolblau Präparates herausstellte (vgl. Kapitel 1.3.4.2) waren hierin die typischen Zellformen der Stachybotrys-Arten am häufigsten zu finden.

Darüberhinaus wurden im Herbst 1984 5 Strohproben (S), die in verschiedenen Pferdeställen in München/Riem gesammelt worden waren, untersucht.

Stroh 1 (S1) stammte aus einem Traberstall mit 40 Pferden. Es schaute sehr staubig aus, roch vermodert und wurde nur in ange-

feuchtetem Zustand an die Tiere verfüttert. Negative Einwirkungen sollen bei den Pferden nicht eingetreten sein.

Stroh 2 (S2) lag auf dem unüberdachten Vorplatz eines Traberstalles, da es wegen schlechten Geruches und Staubeentwicklung bereits weggeworfen worden war. Es war an mehreren Stellen total schwarz gefärbt. Trotz allem soll es keine gesundheitlichen Beschwerden in diesem Stall gegeben haben.

Stroh 3 (S3) wurde in einem Reitpferdestall mit ca. 35 Pferden entnommen, die in letzter Zeit alle gesund gewesen waren. Strohprobe 4 (S4) stammte aus der Pferdeklinik in Riem.

Strohprobe 5 (S5) war in einem Pferdestall mit 21 Pferden gelagert, die ab und zu husten mußten.

Eine weitere Strohprobe (K) stammte aus der Klinik für Innere Medizin der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Vergleichend dazu wurden Hautgeschabsel, sowie Haare und Horn-teile, wie Krallen von Haustieren aus dem Diagnostikmaterial des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, auf Vorkommen von möglicherweise aus Futter oder Einstreu stammenden Pilzen untersucht. Zur Untersuchung gelangte auch Wandbelag eines Zierfischbetriebes: sowohl die Wände als auch die Aquarien hatten einen starken Pilzbefall. Es kam zum Fischsterben und zur starken Rötung der Haut an Händen und Armen der Mitarbeiter, die die Tiere umsetzten oder die Becken reinigten. Der Belag war völlig schwarz. Nach Anfertigung eines Laktophenolblau-Präparates konnten unter dem Mikroskop massenhaft *Stachybotrys*-Sporen und Konidiophoren mit Phialiden erkannt werden.

1.2 Herkunft der *Stachybotrys atra*-Referenzstämme

Die Stämme dieser Species konnten im Herbst 1981 vom pflanzen-pathologischen Institut der Universität in Helsinki aus Stroh isoliert werden, das aus einem Betrieb, in dem 12 Bullenkälber verendeten, stammte. Dieses zu Ballen verarbeitete Stroh wurde trotz sehr regnerischem Herbst draußen aufbewahrt. In Valtion tieteeellinen tutkimuslaitos (Helsinki), konnten darin *Trichothecene* nachgewiesen werden.

Diese *Stachybotrys atra*-Stämme wurden freundlicher Weise von Dr. EEVA-LIISA HINTIKKA zu Vergleichszwecken für diese Arbeit zur

Verfügung gestellt.

Nähere Einzelheiten über die Herkunft der Referenzstämme können der Tabelle 45 entnommen werden.

Tabelle 45: *Stachybotrys atra*-Referenzstämme und ihre Herkunft.

Stamm	Substrat
7	Gerstenstroh
10c	Gerstenstroh
15	Gerstenkeimlinge
16	Gerstenkeimlinge
17d	Gerstenstroh
20a	Gerstenstroh

1.3 Mykologische Untersuchungen

1.3.1 Prüfung der Eignung der Nährmedien für die Anzucht von *Stachybotrys atra*

Um sicher zu gehen, daß die ausgewählten Nährböden von *Stachybotrys atra* zufriedenstellendes Wachstum gewährleisten, wurden die sechs *Stachybotrys atra*-Referenzstämme auf verschiedenen Substraten angezüchtet und ihr kulturmorphologisches Verhalten zum Zwecke des sicheren Erkennens bei Vorkommen im hiesigen Probenmaterial studiert (vgl. Abbildung 17 und Tabelle 46).

Die *Stachybotrys atra*-Referenzstämme wurden mit einer abgeflamten Öse unter sterilen Kautelen auf die verschiedenen Nährmedien übertragen. Bei makroskopisch sichtbarem Wachstum auf Filterpapier wurde wiederum mit einer abgeflamten Öse Material auf Czapek Dox- und Sabouraud-Glucose-Agar übertragen und das Wachstum weiter beobachtet.

Tabelle 46 : Übersicht über die verwendeten Nährboden

Medium	Herkunft	Herstellung/Menge
1. Czapek Dox - Agar	CM 97, Oxoid	*
2. Sabouraud 2 % Glucose-Agar	M 7351, Merck	*
3. Filterpapier	S&S Rundfilter 90mm Schleicher & Schüll	15 Min. autoklaviert, gefaltet, mit Aqua steril angefeuchtet
4. Zellulose-Agar	Aflacel: Cellulose mikrokristallin (Avicel), M 2330 Merck	7 g
	Agar Agar: Bacto- Agar, Nr.0140-1 Difco	4g
Zusatz	Penicillin/ Streptothetat- lösung	Penicillin 4 Ampullen (je 1000.000 IE) + Streptothetat 400mg in 100ml Aq.dest ge- löst, steril filtriert 5ml
		H ₂ O 500ml
5. Weizenkleie- Agar	Weizenkleie, han- delsüblich	wie Zellulose-Agar bearbeitet

* Isolierung: Zusatz wie bei Zelluloseagar

1.3.2 Isolierung von Pilzstämmen aus dem Probenmaterial

In Anlehnung an das Oberflächenverfahren von GEDEK (1974) wurden jeweils 10 g einer Futtermittelprobe in einer Flasche mit 90 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 0,05% Pepton aus Fleisch (Merck) 30 Minuten geschüttelt, eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:1000 hergestellt und von jeder dieser Verdünnungen jeweils 0,1 ml auf folgende Nährmedien gespatelt bzw. aufgetropft (vgl. Tabelle 46):

- Czapek Dox-Agar
- Sabouraud Glucose-Agar
- Filterpapier und
- Zellulose-Agar (nicht bei allen Proben)

Verschiedentlich wurden von einigen Futtermittelproben Partikel direkt auf eine mit sterilem Filterpapier bedeckten Zellulose-Agar- und/oder Czapek Dox-Agarplatte gelegt.

Die beimpften Platten wurden im Brutschrank bei Zimmertemperatur gehalten und ab dem 3. Tag auf das Wachstum von Pilzen hin untersucht.

Alle dunkel bzw. rosa gefärbten Pilzkolonien wurden unter dem Mikroskop direkt oder mit Hilfe der Anfertigung eines Laktophenolblau-Präparates untersucht. Zur Gewinnung von Reinkulturen erfolgte eine Vereinzelung unter Anwendung des Verdünnungsausschüßes. Der Vorgang wurde wiederholt, falls das Ziel noch nicht erreicht war. Sobald Reinkulturen vorlagen wurde eine Suspension hergestellt und diese für die sich anschließenden Untersuchungen im Kühlschrank aufbewahrt.

1.3.3 Herstellung von Suspensionen zur Keimzahlbestimmung

Die Suspensionen wurden nach der Methode von MCGINNIS et.al. (1974) hergestellt. Dazu wurde von den Reinkulturen mit einer Öse Material auf Czapek Dox-Schrägar überimpft und die Röhrchen bei Zimmertemperatur im Dunklen aufbewahrt. Nach Bildung von fruktifizierendem Myzel (nach 1-2 Wochen) wurden die Pilzkulturen 2x mit je 2 ml sterilem Aqua dest. abgeschwemmt, in kleine sterile Glasschraubflaschen abgefüllt und im Kühlschrank bei + 4 °C

gelagert.

1.3.4 Identifizierung

1.3.4.1 Kriterien für die Identifizierung

Die Identifizierung der isolierten Pilzstämmen erfolgte auf Grund ihrer Makro- und Mikromorphologie. Folgende Bücher wurden dazu verwendet: BARRON, 1968: Genera of Hyphomycetes from soil, ELLIS, 1971: Dematiaceous hyphomycetes, GAMS, 1971: Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes), GEDEK, 1980: Kompendium der medizinischen Mykologie. Ferner wurden die isolierten, vermutlich zur Gattung Stachybotrys gehörigen Stämme mit den bereits bestimmten Referenzstämmen und mit den von JONG und DAVIS (1976) gemachten Angaben verglichen.

1.3.4.2 Lichtmikroskopie

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden die Pilze entweder direkt in den Petrischalen, mit Tesaabklatschpräparat oder nach Herstellung eines Laktophenolblau Präparates (zit. GEDEK, 1980; vgl. Tabelle 47) im Durchlicht bei 125-, 312.5-, 500- und/oder 1250-facher Vergrößerung betrachtet.

Tabelle 47: Zusammensetzung und Herstellung von Lactophenolblaulösung für lichtmikroskopische Präparate.

Substanzen	Menge	Herstellung
Phenolkristalle	20 g	Phenolkristalle erhitzen → Lösung 0,05 g Wasserblau dazugeben
Milchsäure	20 ml	
Glycerin	40 ml	
Aq.dest.	20 ml	

Von bereits makroskopisch sichtbar pilzbefallenen Futtermitteln wurden direkt Tesaabklatschpräparate angefertigt.

Bei mikroskopischen Vermessungen wurden eine Woche alte Kulturen auf Sporengröße und Sporenform untersucht, wobei das Probenmaterial von der Mitte der Kulturen verwendet wurde. Der mikroskopischen Vermessung zugrunde lag ein Bildverarbeitungssystem (Image Processing System = IPS), das eine Serienvermessung der Pilzpräparate erlaubte.

1.3.4.3 Elektronenmikroskopie

Von eine Woche alten auf Czapek Dox-Agar gewachsenen Kulturen wurde mit Tesafilm Material abgetragen, auf einen Probenteller geklebt und mit Kohle eine Verbindung hergestellt. Diese Präparate wurden 2 Minuten mit Gold besputtert und mit einem JEOL JSM-840 Scanning-Elektronenmikroskop untersucht. Das angeschlossene Image Processing System (IPS) erlaubte eine meßtechnische Analyse, sowie eine optimierte visuelle Darstellung.

1.4 Toxikologische Untersuchungen

Ausgewählte Pilzisolat e wurden toxikologisch untersucht.

1.4.1 Kultivierung der Referenzstämme auf natürlichem Substrat

Um den Einfluß des Substrates auf die Bildung von toxischen Stoffwechselprodukten vergleichen zu können, wurden die Referenzstämme sowohl auf natürlichem, als auch auf künstlichem Substrat angezüchtet. Die toxikologischen Untersuchungen der, im Rahmen dieser Arbeit isolierten Pilzstämme, erfolgte dagegen ausschließlich nur nach Anzucht auf künstlichen Nährmedien.

Die Referenzstämme (0,1 ml Sporensuspension) wurden auf 50 g gemahlenen, autoklavierten (1/2 Stunde bei 221 °C) und mit 50 ml sterilen Aqua dest. versetztem Hafer in Breed-Demeter-Flaschen eine Woche lang im Dunklen bei Zimmertemperatur kultiviert.

1.4.2 Kultivierung der Referenzstämme und Wildstämme auf Czapek Dox-Agar

Sowohl die Referenzstämme als auch die isolierten Pilzstämme wurden auf Czapek Dox-Agarplatten eine Woche lang im Dunklen bei Zimmertemperatur kultiviert. Pro Referenzstamm bzw. Wildstamm wurden jeweils vier Parallelansätze angelegt und davon jeweils drei Platten zur weiteren Verarbeitung ausgewählt. Die Auswahl erfolgte nach Wachstumsintensität und Sporulationsstärke der kultivierten Stämme, d.h. der am wenigsten bewachsene und am spärlichsten versportete Parallelansatz eines Pilzstammes wurde nicht verwendet.

1.4.3 Extraktion

Die Ansätze der Stachybotrys-Referenzstämme auf Hafer wurden mit jeweils 250 ml Ethylacetat über Nacht extrahiert; am nächsten Tag wurde der Extrakt filtriert, das Filtrat im Rotationsverdampfer eingeeengt, der Extrakt mit 4 ml Ethylacetat in kleine Schraubflaschen überführt und bis zum völligen Abdampfen unter dem Abzug aufbewahrt.

In die bewachsenen Petrischalen wurden jeweils 5 ml Ethylacetat (Merk, Art. 9623) gegeben, so daß der ganze Pilzrasen damit bedeckt war. Anschließend wurde der Agar mit einem sterilen Skalpell in kleine Stücke geschnitten und das Material in einen Erlenmeyerkolben überführt. Die Petrischale wurde mit 5 ml Ethylacetat nachgespült und die Spülflüssigkeit in den Kolben gegeben. Nach Zugabe von 40 ml weiteren Ethylacetates zum Erlenmeyerkolben wurde das Myzel und der Agar 12 Stunden auf einem Laborschüttler extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt filtriert und das Filtrat im Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 4 ml Ethylacetat aufgenommen und die 3 Parallelansätze der Extrakte jedes Pilzstammes vereinigt und dann je 4 ml in 3 kleine Glasschraubflaschen überführt um 3 Schraubflaschen mit gleicher Menge Rohtoxin zu erhalten, falls einer der Nachweise wiederholt werden sollte. Der Rückstand mit dem Ethylacetat wurde unter dem Abzug konzentriert.

1.4.4 Biologische Testverfahren

Die Extrakte der Pilzisolats wurden im Hauttoxizitätstest und Zellkulturtest untersucht. In Einzelfällen erfolgte auch eine Prüfung im Mäusetoxizitätstest.

1.4.4.1 Hauttoxizitätstest

Angewandt wurde der Hauttoxizitätstest nach WEI et.al. (1972), mit dem dermatotoxische Mykotoxine, wie z.B. Trichothecene der Gruppe A und makrozyklische Trichothecene erfaßt werden können (UENO, 1973).

Die Pilzextrakte wurden in 100 µl Methanol aufgenommen und mit einer Öse jeweils 10 µl auf die rasierte und enthaarte Meerschweinchenhaut (Pirbright-white/Kisslegg 200-250 g) aufgetragen. Zu beobachtende dermatotoxische Reaktionen, wie Rötung, Schwellung und Nekrose wurden nach 24, 48, 78 und 120 Stunden notiert. In Tabelle 48 sind die Kriterien zur Auswertung des Hauttoxizitätstestes wiedergegeben.

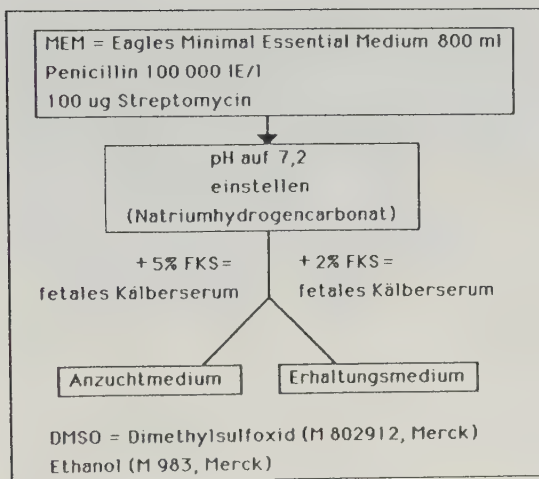
Tabelle 48: Kriterien zur Auswertung des Hauttoxizitätstestes.

Bewertung	Kriterien
-	Keine Reaktion
+	Rötung
++	Rötung, Schwellung
+++	Rötung, Schwellung, Nekrose
++++	Rötung, Schwellung, Nekrose; die Entzündung breitet sich in die Umgebung aus

1.4.4.2 Zelltoxizitätstest

Für den Zelltoxizitätstest wurden fetale Kälberlungen-Zellen (BEL-Zellen) verwendet, deren Herstellung nach Angaben von MAYR et.al. (1974) erfolgte. Über die hierfür benötigten Materialien informiert die Tabelle 49.

Tabelle 49: Für die Bearbeitung und Beimpfung der Zellkulturen benötigte Materialien und Zusammensetzung von Anzucht- und Erhaltungsmedium.



Der in kleinen Schraubfläschen befindliche Extrakt wurde mit 0,5 ml Ethanol in Reagenzröhrchen überführt und anschließend das Ethanol mit N_2 abgedampft. Das Material wurde in 100 µl DMSO gelöst und mit 10 ml Erhaltungsmedium (MEM und 2% FKS) verdünnt. Damit wurde dann eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:10 mit 5 Verdünnungsstufen hergestellt (vgl. Abbildung 11).

Das Aufzuchtmedium der Zellkulturröhrchen wurde dekantiert und jeweils 2ml der Verdünnungen des Extraktes im Erhaltungsmedium + DMSO in ein Zellkultur-Röhrchen eingegeben. Pro Verdünnung wurden jeweils 3 Parallelen angesetzt (vgl. Abbildung 11).

Als Kontrolle diente unbewachsener Czapek Dox-Agar nach Extraktion wie unter 1.4.3 beschrieben, der in gleicher Weise auf die Zellkulturröhrchen verimpft wurde (Czapek Dox-Kontrolle). Eine weitere Kontrolle wurde angesetzt mit 100 µl DMSO in 10 ml Erhaltungsmedium und wiederum in 3 Parallelen mitgeführt. Sämtliche Zellkulturröhrchen wurden in einem Brutschrank bei

37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch bei Lupenvergrößerung nach 1 bis 5 Stunden sowie nach 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 Tagen, und richtete sich nach den in Tabelle 50 angegebenen Kriterien.

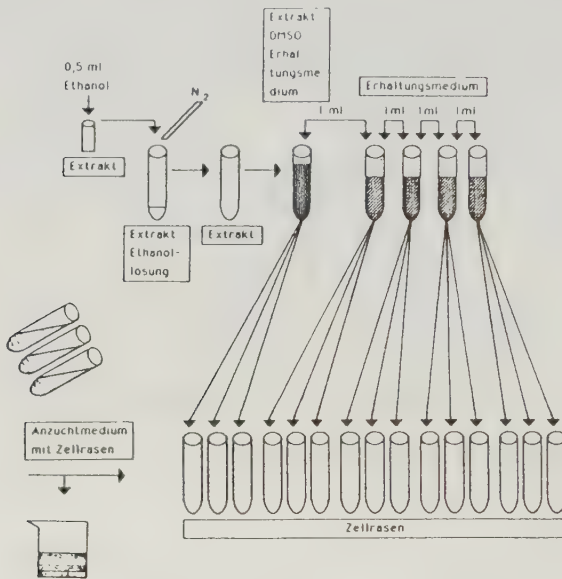


Abbildung 11: Bearbeitung eines Extraktes für den Zellkulturtest

Tabelle 50: Auswertungskriterien für den Zelltoxizitätstest

Kriterien	Einstufung
unbeschädigt	-
Zellrasen unverändert	+
Zellen, beginnende Formveränderungen und Abkugelungen (%)	
Zellrasen stellenweise Lücken	++
Zellen, Formveränderungen	
Abkugelungen (%), wenn vorhanden	
Zellrasen an einigen Stellen noch zu finden, sonst keine kontinuierliche Verbindung zwischen den Zellen vorhanden	+++
Zellen zerstört, vereinzelt noch sichtbar, Abkugelungen (%)	
keine einmal vorhandenen Bestandteile mehr zu erkennen	++++

Die einzelnen Toxizitätsgrade geben die Abbildungen 12-16 wieder.



Abbildung 12: Zellkontrolle



Abbildungen 13-16: Zelltoxizitätsstufen

1.4.4.3 Mäusetoxizitätstest

In Einzelfällen (Proben 223/85, 225/85 und 226/85) wurden weiße Mäuse mit 1 Grammaquivalent Probenmaterial in 0,2 ml einer Mischung von 100 µl Ethanol, 1ml DMSO und 0,5 ml Aqua dest. i.p. gespritzt und die Reaktionen beobachtet.

Bei der Probe 223/85 wurde auch eine orale Applikation des Futters an zwei weiße Mäuse durchgeführt. Diesen Tieren wurde das Futtermittel nach 12 Stunden fasten (Probe 223/85) vorgelegt; die Tiere erhielten 5 Tage lang kein anderes Futter.

Der besseren Übersicht halber faßt die Abbildung 17 die einzelnen Arbeitsschritte des Untersuchungsganges in einem Schema zusammen.

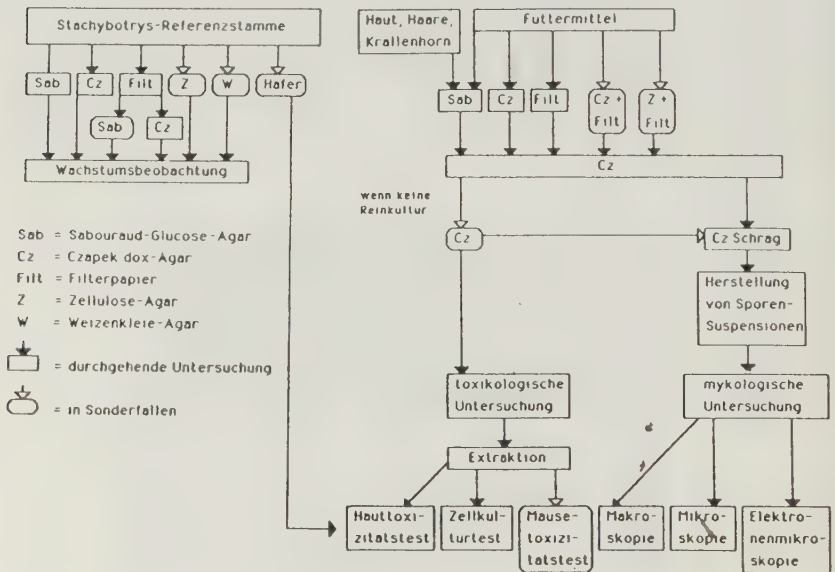


Abbildung 17: Schema des Untersuchungsganges

2. Ergebnisse und deren Besprechung

2.1 Vorkommen von Pilzen unterschiedlicher systematischer Zugehörigkeit in Futtermitteln und anderen Untersuchungsmaterialien

Aus Futtermitteln und Einstreu wurden insgesamt 322 verschiedene Pilzstämmen isoliert. Über ihre systematische Zugehörigkeit und ihr Vorkommen in den 102 Futtermitteln gibt Tabelle 51 Aufschluß. Die Tabelle 52 faßt die Ergebnisse zusammen und informiert über den prozentualen Anteil der verschiedenen nachgewiesenen Pilzgattungen an der Gesamtzahl der Pilze, sowie über die prozentuale Häufigkeit der Pilzgattungen bezogen auf die Zahl der untersuchten Futtermittel. Des weiteren werden auch die Ergebnisse der anderen Materialien in Tabelle 51 mitgeteilt.

Tabelle 52: Häufigkeitsverteilung im Vorkommen von Pilzen bezogen auf die systematische Zugehörigkeit und die Futtermittelkontamination.

Pilze	Anzahl der Nachweise	relativer Anteil am Pilzbesatz	Futtermittelkontaminationsrate
Aspergillus spp	65	20,19 %	63,73 %
Cladosporium spp	61	18,94 %	59,80 %
Penicillium spp	39	12,11 %	38,24 %
Mucorales spp.	34	10,56 %	33,33 %
cephalosporium-artige Pilze	33	10,25 %	32,35 %
Alternaria spp.	27	8,39 %	26,47 %
Scopulariopsis spp.	18	5,59 %	17,65 %
Fusarium spp.	16	4,97 %	15,84 %
Trichothecium spp	8	2,48 %	7,84 %
Stachybotrys spp.	5	1,55 %	4,90 %
Scedosporium	1	0,31 %	0,98 %
Cymatothea	1	0,31 %	0,98 %
nicht bestimmte	14	4,35 %	13,73 %

Tabelle 51: In Futtermittel, Einstreu und anderen Materialien nachgewiesene Pilze und deren Zugehörigkeit zu bekannten Pilzgattungen der Hyphomycetes.

Probenmaterial	Labor-Nr	A	Cl	P	M	Ce	Al	S	F	U	T	St	Sc	C
Hafer 19,61 % (15,69 %)	186/84		+											
	* 1/85	+	+	+	+	+	+		+		+			
	* 2/85	+		+	+				+	+	+			
	* 3/85	+		+	+	+			+		+			
	* 4/85	+		+	+		+		+		+		+	
	15/85	+	+	+			+							
	17/85	+	+	+		+	+							
	18/85	+	+	+	+		+							
	19/85		+			+	+							
	20/85	+	+	+			+							
	35/85		+	+	+	+			+					
	41/85					+								
	50/85		+			+	+							
	57/85		+			+								
	59/85	+	+		+	+				+				
	91/85	+	+			+								
	223/85		+			+	+							
	355/85		+											
	379/85	+	+	+	+		+							
	382/85	+	+	+	+			+						
Haferflocken 0,98 %	184/85		+				+							
Weizen 9,8 %	220/84	+	+											
	36/85	+		+	+					+				
	51/85					+								
	56/85	+	+	+		+								
	58/85	+	+		+				+					
	89/85		+											
	148/85	+	+		+		+							
	378/85		+	+	+		+	+						
	383/85	+		+	+		+							
	384/85		+	+	+		+							
Weizenkleie 0,98 %	185/84	+												
Roggengries- kleie 0,98 %	187/84		+							+				
Roggen 0,98 %	7/85			+		+	+							

Fortsetzung Tabelle 51:

Probenmaterial	Labor-Nr	A	Cl	P	M	Ce	Al	S	F	U	T	St	Sc	C
Pellets 12,75 %	150/84	+												
	201/84	+	+		+									
	216/84	+	+											
	221/84		+				+			+				
	228/84		+											
	229/84	+	+	+						+				
	236/84	+	+	+										
	255/84						+							
	63/84	+	+	+										
	70/85	+		+										
	223/85	+	+	+	+							+		
	255/85	+	+											
	335/85	+		+						+				
Verschiedene Fertigfutter- mittel 12,75 %	127/84		+									+		
	128/84	+	+											
	204/84	+		+	+	+			+					
	206/84	+	+	+		+		+						
	22/85					+			+					
	37/85	+												
	179/85			+	+									
	183/85	+						+						
	203/85	+												
	224/85		+	+	+	+		+	+					
	257/85	+			+			+						
	381/85		+	+	+									
	337/85	+												
Bierhefe 1,96 %	211/84		+			+								
	212/84		+											
Eiweißkonzentrat 0,98 %	129/84	+	+		+	+						+		
Weißklee 0,98 %	207/84	+	+											+
Tapioka 0,98 %	129/85	+		+	+									
Gulicuramin 0,98 %	176/85		+	+				+						

Fortsetzung Tabelle 51:

Pilze aus anderen Materialien	Labor- Nr	A	Cl	P	M	Ce	Al	S	F	U	T	St	Sc	C
Belag (Aquarium)	181/84				+	+	+	+	+			+		
Haut und Haare	129/84						+							
	179/84										+			
	702/85										+			
	703/85						+							
	706/85						+							
	711/85						+							
	814/85						+							
Krallenhorn	696/85						+							

- A = Genus Aspergillus
 Cl = Genus Cladosporium
 P = Genus Penicillium
 M = Ordnung Mucorales
 Ce = Cephalosporium-artige Pilze
 Al = Genus Alternaria
 S = Genus Scopulariopsis
 F = Genus Fusarium
 U = Unbekannte, nicht bestimmte Pilze
 T = Genus Trichothecium
 St = Genus Stachybotrys
 Sc = Genus Scedosporium
 C = Genus Cymatothea

Aspergillen und Cladosporien gehörten damit zu den am häufigsten in Futtermitteln nachweisbaren Pilzgattungen. Hafer, Weizen, Gerste und Mischfutter waren zusätzlich häufig mit Penicillien kontaminiert.

Alternarien und Cephalosporium-artige Pilze wurden vor allem auf Stroh und Hafer gezüchtet. Alternarien wurden auch häufig auf Weizen angetroffen; sie fehlten auf Gerste. Weitere Einzelheiten können den Abbildungen 18-22 entnommen werden.

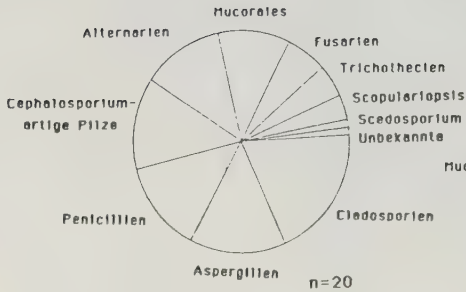


Abbildung 18 Hafer

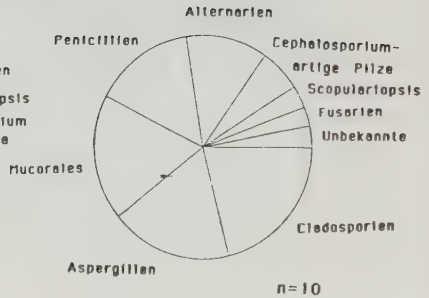


Abbildung 19 Weizen

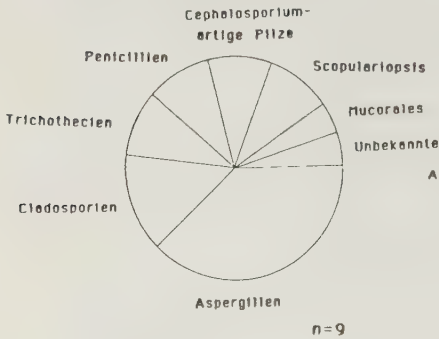


Abbildung 20 Gerste

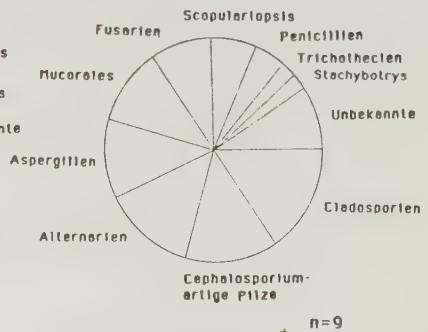


Abbildung 21 Stroh

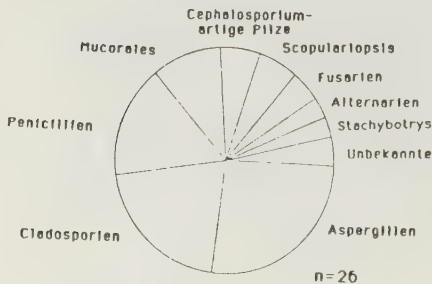


Abbildung 22 Mischfutter

n = Anzahl der untersuchten Proben

Es wurden insgesamt 63 Futtermittelproben sowohl unter Verwendung von Filterpapier- als auch von Sabouraud-Glucose-/Czapek Dox-Agar als Anzuchtmedium untersucht. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse hinsichtlich des kulturellen Nachweises der verschiedenen Pilzgattungen aus diesem Probenmaterial erfolgt in Tabelle 53.

Aus Tabelle 53 geht eindeutig der Unterschied im Bezug auf die Züchtbarkeit der Pilze nach angebotenen Substrat hervor. Insgesamt wurden 245 Pilze aus diesen 63 Futtermittelproben isoliert. Wenn es sich nicht um Dematiaceae handelte, wurden in 21-23% der Fälle die gleichen Pilzgattungen mit beiden Verfahren isoliert. Was jedoch die Schwärzepilze (*Stachybotrys*, *Alternaria*, *Cladosporium*) jedoch betrifft traf dies nur für 7,80% zu.

Der Anteil der Proben, bei denen mit Anzucht auf Sabouraud-Glucose-/Czapek Dox-Agar keine Dematiaceae nachgewiesen werden konnten, auf Filterpapier aber *Cladosporien* zur Entwicklung kamen, betrug 28,57%. Für *Alternarien* lag der vergleichbare Wert bei 4,76%. Dies bedeutet zugleich, daß vor allem viele *Cladosporien* bei Verwendung von Sabouraud-Glucose-/Czapek dox-Medien nicht erfaßt werden (vgl. auch Tabelle 51).

Bei Beobachtung des Wachstum der einzelnen Pilzgattungen aus den vergleichend untersuchten Probenmaterial auf Filterpapier sowie Sabouraud-Glucose-/Czapek Dox-Agar, ergaben sich teilweise erhebliche Unterschiede (Tabelle 54).

Bei der Anzucht auf Filterpapier wurden in über 60% der Proben *Aspergillen* und *Cladosporien* gefunden. 20-40% der Proben waren mit *Penicillien*, *Cephalosporium*-artigen Pilzen und *Mucorales*, 10-20% mit *Alternarien*, *Scopulariopsis*, *Fusarien*, und *Stachybotrys* und 1-10% mit *Trichothecien*, *Scedosporium* und *Cymatothea* kontaminiert.

Damit wurden bei der Anzucht auf Filterpapier *Aspergillen*, *Cladosporien*, *Cephalosporium*-artige Pilze, *Scopulariopsis*, *Trichothecium* und *Stachybotrys* spp. häufiger isoliert als bei der Kultivierung auf Sabouraud-Glucose-/Czapek Dox-Agar.

Bei der Anzucht auf Sabouraud-Glucose-/Czapek Dox-Agar waren die Proben zu über 40-50% mit *Aspergillen*, *Penicillien* und *Dematiaceae* kontaminiert. Als *Dematiaceae* wurden hier alle dunkel gefärbten Pilze klassifiziert, ohne eine genauere Bestimmung der Gattungszugehörigkeit vorzunehmen, somit handelte es sich u.a. um *Cladosporien* und *Alternarien*. 20-40% der Futtermittel waren mit

[illegible]

Fortsetzung Tabelle 53:

Probenmaterial	Labor-Nr	A	Cl	P	M	Ce	Al	S	F	U	T	St	Sc	C
Mehl	239/84													
	334/85													
Silage	234/84													
	184/85													
	236/85													
Pellets	150/84													
	201/84													
	221/84													
	228/84													
	229/84													
	236/84													
	70/85													
	223/85													
	335/85													
	70/85													
	223/85													
	335/85													
	335/85													
	335/85													
Verschiedene Fertigfutter- mittel	127/84													
	128/84													
	204/84													
	206/84													
	22/85													
	179/85													
	224/85													
	337/85													
Bierhefe	211/84													
Eiweißkonzentrat	129/84													
Tapjoka	129/85													
Pilze aus anderem Material														
Befag (Aquarium)	181/84													

 Sabouraud-Glucose-/Czapek Dox-Agar

 Filterpapier

Abkürzungen vgl. Tabelle 51.

Mucorales, Fusarien und Cephalosporium-artigen Pilzen befallen und in 1-10% der Proben waren Scopulariopsis, Stachybotrys und Cymatothea spp. zu finden. Bei Verimpfung auf diese Nährböden (Sabouraud-Glucose-/Czapek Dox-Agar) waren Penicillien, Mucorales und Fusarien häufiger zu finden als bei der Anzucht auf Filterpapier. Trichothecien gelangten auf Sabouraud-Glucose-/Czapek Dox-Agar überhaupt nicht zur Entwicklung.

Tabelle 54: Nachweis von Pilzen unterschiedlicher systematischer Zugehörigkeit in Abhängigkeit vom Substrat.

Pilzgattungen	Filterpapier (%)	Sabouraud-Glucose- bzw Czapek Dox-Agar (%)
Aspergillus spp	61,91	47,62
Cladosporium spp	61,07	*
Penicillium spp.	30,16	44,44
Mucorales	23,81	39,92
cephalosporium-artige Pilze	39,68	20,64
Alternaria spp.	19,05	*
Scopulariopsis spp.	14,29	8,33
Fusarium spp.	14,29	33,33
Trichothecium spp	3,18	
Stachybotrys spp.	10,00	3,33
Scedosporium	1,59	*
Cymatothea	1,59	1,59
nicht bestimmte Pilze	12,70	• 42,86

- * Diese Pilze sind hauptsächlich unter den Dematiaceae zu finden
- Als Dematiaceae zusammengefaßte Pilzgattungen

Von den isolierten Pilzen wurden folgende Vertreter für die weiteren Untersuchungen ausgewählt:

Die Stachybotrys-Stämme 127/84, 129/84, 181/84, 223/85, 225/85, 226/85 sowie die finnischen Referenzstämme, ferner die Alternaria-Stämme 129/84H, 255/84, H4Z, 7/85, 226/85, 696/85H,

703/85H, 706/85H, 711/85H, 814/85H, Trichothecium-Stämme S1, H1, H2, H3, H4, 179/84H, 34/85, 225/85, 702/85H sowie ein Stamm der Gattung Scedosporium K.

2.2 Wachstum der Stachybotrys atra-Referenzstämme auf den verschiedenen Substraten

Das Wachstum auf Filterpapier erfolgte makroskopisch gesehen zwar langsamer als auf Czapek Dox- und Sabouraud-Glucose-Agar, da Filterpapier aber bekanntlich zur Isolierung für Stachybotrys spp. geeigneter sein soll als andere Medien (HINTIKKA, 1973), wurde es hauptsächlich verwendet.

Die Stachybotrys atra-Stämme wuchsen gut auf Czapek Dox-Agar und Sabouraud-Glucose-Agar, jedoch zeigte sich bei einem Beimpfungsversuch mit den, auf Filterpapier gewachsenen Referenzstämmen (vgl. Tabelle 55), eine raschere Vermehrung auf Czapek Dox-Agar als auf Sabouraud-Glucose-Agar. Aus diesem Grunde wurde Czapek Dox-Agar letztenendes als Medium für Subkulturen ausgewählt.

Tabelle 55: Durchmesser der Kolonien von Stachybotrys atra nach Überimpfung auf Czapek Dox-(Cz) und Sabouraud-Glucose-Agar (Sab).

Zeit	Agar	Stamm 10c	Stamm 15	Stamm 16	Stamm 17d	Stamm 20a
6.Tag	Cz	d=0,7- 1,36 cm	d=1,5cm	d=0,49cm	d=0,96- 1,4cm	d=1,8- 2,38 cm
	Sab	d=0,09cm	nicht ge- wachsen	d=0,64cm	d=0,1- 0,28 cm	nicht ge- wachsen

Bei Anzucht auf Zelluloseagar kam es zu einer sehr spärlichen Sporulation. Dieser wurde daher bei späteren Untersuchungen nur gelegentlich eingesetzt, hauptsächlich bei stark kontaminierten Proben. Dazu wurde Futtermittel auf ein direkt auf Agar gelegtes Filterpapier aufgetragen. Es eignete sich als Medium für die Isolierung von Cladosporien auch dann, wenn von dem Futtermittel eine sterile physiologische Kochsalzlösung mit Peptonzusatz her-

Tabelle 56: Aussehen der Kolonien von *Stachybotrys atra* Referenzstämmen auf Nährboden resp. Filterpapier.

Tag	Substrat	Stamm 7	Stamm 10c	Stamm 17d	Stamm 15	Stamm 16	Stamm 20a
3	Sab	weiß bis braunlich	in der Mitte schwarz	-	braunlich	ein Paar braunliche Stellen	-
	Cz	weiß, in der Mitte schwarz	weiß u schwarz	weiß, stellenweise schwarz	weiß	weiß	weiß
4	Sab	weiß u braun	hellbraun mit weißem Rand	weiß, stellenweise braun	hellbraun	hellbraun	weiß
	Cz	weiß, stellenweise schwarz	weiß, versetzt mit viel schwarz	weiß, stellenweise schwarz	weiß, stellenweise schwarz	weiß u schwarz	weiß
6	Sab	weiß u braun	braun u schwarz mit weißem Rand	weiß u braun, pulvrig, dünn	hellbraun u weiß	wie 15	weiß
	Cz	gelblich-braun bis rötlich (U), schwarz u. weiß, pulvrig	rötlich-braun (U), schwarz, in der Mitte gelblich	rötlich-braun (U), gelblich, schwarz u weiß	rötlich braun (U), rosa, in der Mitte grün bis gelb	wie 15	weiß u wenig schwarz
7	Sab	hellbraun, braun mit hellem Rand, od weiß	rötlich-braun (U), schwarz mit dünnem weißem Rand	wie 10c	viel weißes Wachstum, auf der Unterseite heller braun als die anderen		
	Cz	grünlich bis rötlich-braun (U), grünlich-braun	rötlich-braun (U), hauptsächlich schwarz	wie 10c	rötlich braun auf Unterseite, sonst schwarz u weiß		
	Filt	-	einige schwarze Punkte	-	einige schwarze Punkte	einige schwarze Punkte	-

Sab = Sabouraud-Glucose-Agar (U) = Unterseite

Cz = Czapek Dox-Agar

gestellt worden war (vgl. Kapitel 1.3.2). Da Cladosporien sich allerdings auch gut auf Filterpapier entwickelten, wurde Zelloseagar nicht kontinuierlich bei den Untersuchungen verwendet. Weizenkleie-Agar in der Zusammensetzung, wie in Tabelle 40 angegeben, erwies sich nicht als sonderlich geeignet für die Isolierung. Es kam nach Zusatz von Penicillin / Streptothentat-Lösung zu keinem selektiven Wachstum der Pilze.

Tabelle 56 gibt die Makromorphologie der *Stachybotrys atra*-Referenzstämme auf den Nährmedien wieder, die bei den weiteren Untersuchungen der Stämme ständig eingesetzt wurden.

2.3 Isolierung von *Stachybotrys*-Wildstämmen

Der Tabelle 57 ist zu entnehmen, aus welchen Proben Vertreter der Gattung *Stachybotrys* züchtbar waren.

Tabelle 57: Herkunft der *Stachybotrys*-Wildstämmen mit Angabe der Kulturmedien.

Stamm	Substrat	Anzuchtmedium	Subkulturmedium
127/84	Mischfutter	Filterpapier vgl. 1.3.2	Czapek Dox-Agar
223/85	Pellets	Czapek Dox-Agar + Filterpapier	
129/84	Eiweißkonzentrat	Filterpapier vgl. 1.3.2	
225/85	Heu	Czapek Dox-Agar + Filterpapier	
226/85	Stroh	Czapek Dox-Agar + Filterpapier	
181/84	Belag einer Aquariumwand	Filterpapier vgl. 1.3.2	

Die Isolierung mit Filterpapier nahm bei Proben, die anscheinend nur gering mit *Stachybotrys* kontaminiert waren, viel Zeit in Anspruch (Stämme 127/84 und 129/84). Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Subkultivierung war die Sporulation auf Filterpapier, damit die Entwicklung auf Czapek Dox-Agar fortgesetzt

werden konnte, und dies nahm bei diesen Stämmen 3-4 Monate in Anspruch.

Bei den Proben 223/85 und 225/85 gelang zunächst keine Isolierung bei Verwendung von Sabouraud-Glucose-, Czapek Dox-, von Zellulose-Agar oder Filterpapier und vorheriger Verdünnung des Untersuchungsmaterials. Erst eine direkte Verimpfung der Pellets oder Heu auf Czapek Dox-Agar, mit Abdeckung durch Filterpapier, veranlasste den Pilz nach einer Woche zur Vermehrung.

Nur bei Proben, die offensichtlich stark mit Pilzen der Gattung *Stachybotrys* befallen waren, wie dies für 181/84 und 226/85 zutraf, gelang eine relativ schnelle Entwicklung auf Filterpapier innerhalb von 20 bis 30 Tagen. Aus diesen Proben konnten allerdings die Pilze auch bei Verwendung der Agarnährböden zur Entwicklung gebracht werden.

2.4 Gattung *Stachybotrys*

2.4.1 Ergebnisse der mykologischen Untersuchung

2.4.1.1 Bestimmung der Keimzahl nach Kulturabschwemmung

Tabelle 58: Keimzahlen der *Stachybotrys*-Stämme nach ein- und zwei-wöchigem Wachstum auf Czapek Dox-Agar bei Zimmertemperatur.

Referenz-Stämme	Stamm	KBE nach 1-wöchiger Kultur	KBE nach 2-wöchiger Kultur
	7	$3,4 \times 10^6$ /ml	$4,0 \times 10^6$ /ml
	10c	$1,2 \times 10^6$ /ml	$6,0 \times 10^6$ /ml
	15	$3,0 \times 10^6$ /ml	$4,0 \times 10^6$ /ml
	16	$6,0 \times 10^6$ /ml	$4,2 \times 10^6$ /ml
	17d	$1,7 \times 10^7$ /ml	$1,0 \times 10^7$ /ml
	20a	$1,0 \times 10^6$ /ml	$1,6 \times 10^6$ /ml
Stachybotrys-Wild-Stämme	127/84	$1,9 \times 10^6$ /ml	$4,0 \times 10^5$ /ml
	129/84	$2,0 \times 10^6$ /ml	$1,8 \times 10^6$ /ml
	181/84	$3,0 \times 10^6$ /ml	$1,0 \times 10^6$ /ml
	223/85	$9,0 \times 10^6$ /ml	$4,7 \times 10^6$ /ml
	225/85	$1,1 \times 10^7$ /ml	$2,0 \times 10^6$ /ml
	226/85	$4,0 \times 10^6$ /ml	$2,0 \times 10^6$ /ml

KBE = Kolonienbildende
Einheiten

Die Bestimmung der Keimzahl zur Beurteilung der Wachstumsintensität erfolgte nach ein- und zweiwöchiger Kultivierung auf Czapek Dox-Schrägagar durch Abschwemmung und Verdünnung. Die Ergebnisse werden in Tabelle 58 festgehalten.

Die Wildstämme sporulierten wie die *Stachybotrys*-Referenzstämme, denn es gab keinen nennenswerten Unterschied in der Zahl der keimungsfähigen Einheiten.

2.4.1.2 Makromorphologie

Auf natürlichen Medien wie Hafer bildeten die *Stachybotrys*-Stämme eine schwarze, leicht staubende Schicht (vgl. Abbildung 23).

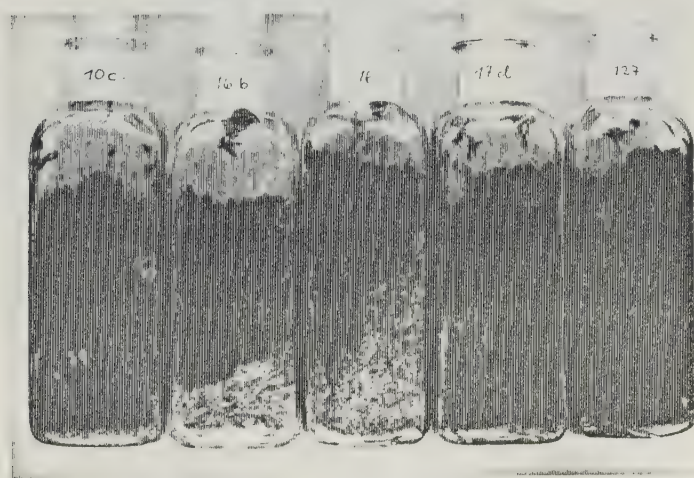


Abbildung 23: Wachstum von Stämmen der Gattung *Stachybotrys* auf Hafer

Auf Filterpapier wuchsen alle *Stachybotrys*-Stämme schwarz und bildeten pulvrige Lagen (vgl. Abbildung 24).

Bei der Züchtung der Stämme 127/84 und 129/84 auf Filterpapier war vor Überwucherung mit diesen *Stachybotrys*-Stämmen ein rosa Fleck an den später schwarz gefärbten Stellen zu beobachten. Da bei der Probe 127/85 auf Filterpapier nur *Stachybotrys* und

Cladosporium isoliert wurden, ist anzunehmen, daß diese Rosa-Einfärbung entweder von Stachybotrys-Wachstum bewirkt wurde oder von einem unbekannten Pilz herrührte, der durch die Dematiaceae unterdrückt wurde. Auf Sabouraud-Glucose- und Czapek Dox-Agar gelang bei dieser Probe die zusätzliche Isolierung von Penicillien, Aspergillen und Mucorales. Auch für Probe 129/85 traf dies zu. Hierbei waren Cephalosporium-artige Pilze und ein Vertreter der Gattung Scopulariopsis nachweisbar (vgl. Tabelle 51).



Abbildung 24: Wachstum von Stachybotrys spp. auf Filterpapier

Die Erscheinung der Rosa-Einfärbung des Filterpapiers gab Anlaß zur Untersuchung von Pilzen, deren Lager rosa gefärbt waren und sich neben den Schwärzepilzen wie diese vermehrten. *

Bei allen Stämmen der Gattung Stachybotrys begann die Entwicklung auf Czapek Dox-Agar mit Bildung von weißem, flaumigem Wachstum, das nach 5 Tagen rötlich-braun bis braun-schwarz oder grünlich-schwarz wurde und nach 2 Wochen sich völlig schwarz zeigte. Ab dem 8. Tag konnte bei den meisten Stämmen aus der Mitte der dunklen Kolonie heraus eine Neubildung von weißem Wachstum beobachtet werden, das sich langsam zum Rand hin ausbreitete. Es lag entweder flach auf der Oberfläche oder bildete einen "Hügel".

lag entweder flach auf der Oberfläche oder bildete einen "Hügel". Alle Kolonien wuchsen, außer der oben erwähnten seltenen Hügelbildung, flach und wiesen erst eine locker weiche dann samtartige Oberfläche auf. Alle Stämme bildeten eine Randzone.

Die Unterseite der Kolonien verfärbte sich bei allen Stämmen rötlich-braun bis gelblich-braun (vgl. Tabelle 59).

Tabelle 59: Kolonienmorphologie der Referenzstämme und der Wildstämme der Gattung *Stachybotrys*.

Stamm	Oberfläche	Farbenspiel		Randzone
		Oberseite	Unterseite	
7	flaumig, flach	gelblich grünlich braun	grünlich	deutlich
10c	flaumig, flach	rötlich bis gelblich braun	rötlich braun	undeutlich
15	flaumig flach	gelblich rötlich braun bis schwarz	rötlich braun	undeutlich
16	flaumig flach	rötlich braun	rötlich braun	undeutlich
17d	flaumig flach	gelblich schwarz	rötlich braun	undeutlich
20a	flaumig flach	rötlich braun	rötlich braun	undeutlich
127/84	flaumig flach	rötlich braun	rötlich braun	deutlich
129/84	flaumig flach	grünlich schwarz	rötlich braun	undeutlich
181/84	flaumig flach	rötlich braun	rötlich braun	undeutlich

Die Abbildung 25 zeigt das Wachstum von einer Kolonie des Stammes 181/84 am 6., 7., 8. und 9. Tag auf Czapek Dox-Agar.

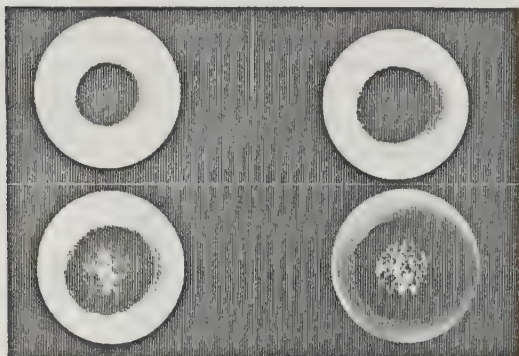


Abbildung 25: Makroskopisches Wachstum des Stammes 181/84 am 6., 7., 8. und 9. Tag.

2.4.1.3 Mikromorphologie im Lichtmikroskop

Tabelle 60 informiert über die mikroskopischen Unterschiede zwischen den Stachybotrys-Stämmen.

Die Entwicklung beginnt mit der **Sporenkeimung**, bei der ein zur Spitze hin sich verjüngender Ausläufer die Wand der Spore durchstößt. Die Keimschlauchbildung war sowohl bei dunklen, dickwandigen als auch bei hellen, dünnwandigen Sporen zu beobachten. Die Keimungsphase war bei den Stämmen 7, 10c, 17d, und 20a noch am 5. Tag die dominierende Entwicklungsform (vgl. Abbildung 26 und Tabelle 60).

Tabelle 60: Mikromorphologie der Referenzstämme und der Wildstämme der Gattung *Stachybotrys* im Lichtmikroskop.

Wild-Stämme	Konidiophoren		Septen	Phialiden		Anzahl	Sporenbildung 5 Tag
	Länge μm	Breite μm		Länge μm	Breite μm		
127/84	25,8-54,1	1,8-4,3	1	8,9-9,2	3,9-4,6	7-8	sehr wenige
129/84	24,7-55,0	1,4-2,5	1	7,5-8,8	3,7-3,9	bis 7	Mantelbildung Verklumpung
181/84	47,7-62,0	3,1-4,9	1	11,4-13,2	5,7-5,3	bis 7	viele
223/85	44,0-71,6	2,0-5,0	1	8,4-10,1	3,8-4,7	3-6	viele
225/85	39,1-54,8	2,0-4,0	1-2	10,8-11,7	4,9-5,8	bis 7	viele
226/85	44,6-95,0	2,4-3,3	1-2	10,9-12,5	4,1-5,5	bis 6	Mantelbildung
Referenzstämme							
7	32,8-40,3	2,7-2,9	1	10,3-12,4	4,8-5,7		nur einzelne
10c	46,5	2,9-3,9	1	9,9-11,1	4,6-5,6		nur einzelne Keimungsphase
15	50,0	2,6-4,0	1	8,9-9,5	4,9-5,3	bis 8	viele, Ver- klumpungen
16	48,8	2,4-4,2	1	12,4-13,2	4,5-5,2		sehr wenige, dunkelbraun
17d	42,3-53,5	2,2-3,4	1	10,0-11,0	4,0-4,5		Keimungsphase
20a	54,5-64,9	2,3-3,1	1	7,0-10,1	3,3-4,4		Keimungsphase



Abbildung 26: Sporenkeimung bei *Stachybotrys*-Stämmen

Der Keimschlauch wurde immer länger und entwickelte sich zur Hyphe, der Basis des Myzels. Beim Stamm 127/84 lagen die Hyphen gelegentlich derart aneinander gebündelt, daß es zur Bildung von dicken Hyphensträngen kam (vgl. Abbildung 27).



Abbildung 27: Strangbildung von Hyphen bei Stamm 127/84

Es kam zur Differenzierung der für *Stachybotrys* typischen Konidienbildungsorgane, den **Konidiophoren** mit ihren an dem freien Ende stehenden **Phialiden**. Schon am 5. Tag waren bei allen Stämmen Phialiden zu beobachten. Da auch schon einzelne Phialiden zur Sporenbildung befähigt waren, ohne daß die vollständige Bildung aller, an einer Konidiophore stehenden Phialiden vollzogen war, wurden die ersten Sporen oft schon parrallel zum Zeitpunkt anhaltender Phialidenbildung produziert. Die zuerst gebildeten Sporen waren dünnwandig und länglicher als die später gebildeten dunklen und dickwandigen Sporen.

Am 5. Tag konnte bei den Stämmen 129/84 und 226/85 schon die Bildung eines, die äußere Sporenwand der zuerstgebildeten Konidien umhüllenden Mantels beobachtet werden (vgl. Abbildungen 36,42 und 61).

Es folgte nun eine Phase schneller **Sporenbildung**. Ab dem 6. Tag konnten dicht zu einem kompakten Gebilde aneinander gedrängte Sporen an den Phialidenenden beobachtet werden. Diese Sporen wurden durch eine hellbraune Substanz fest zusammengehalten. Erst durch gewaltsame Trennung wurden einzelne braune Sporen frei (vgl. Abbildung 28).

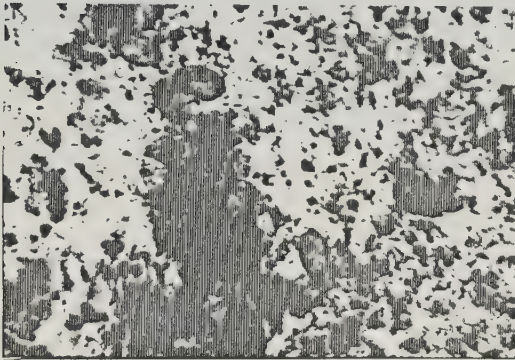


Abbildung 28: Einzeln liegende Stachybotrys-Sporen nach gewaltsamer Abtrennung

Bei den Kolonien konnten ab dem 6. Tag unter dem Mikroskop 5 Zonen vom äußeren Rand der Kultur zur Mitte hin unterschieden werden:

Die erste Zone entsprach dem äußeren Rand der Kolonien, war als heller oder weißer Rand ausgebildet und konnte mikroskopisch betrachtet weiter unterteilt werden. Der äußerste Rand bestand nur aus hyalinen Hyphen, die sich im Laktophenolblau Präparat blau anfärbten. Die darauffolgende Zone setzte sich aus Hyphen und sich in Entwicklung befindlicher, noch unter dem Einfluß der Phialidenbildung stehender Konidiophoren zusammen.

Die 3. Zone setzte sich aus Hyphen und Konidiophoren mit Phialiden, aus denen bereits erste vereinzelte Sporen austraten,

zusammen. Die Sporen waren hauptsächlich hyalin oder hellbraun, selten schon dunkelbraun.

In der 4. Zone hielten sich die Konidiophoren mit den Sporen im Gleichgewicht, wobei hellbraune Konidien in Mehrzahl zu finden waren.

In der Mitte der Kolonie, die die 5. Zone darstellte, waren schließlich massenhaft Sporen zu erkennen, die die anderen Strukturen überdeckten und diese nur noch andeutungsweise erkennbar werden ließen. Sie repräsentierten hauptsächlich die typischen, sich aus mehreren Sporen zusammensetzende, dunkelbraunen Pakete, obwohl dazwischen auch einzelne Sporen zu finden waren, die entweder dunkelbraun oder hellbraun gefärbt waren.

Die ab dem 8. Tag zu beobachtende Neubildung von weißem Myzel in der Mitte der Kolonie wurde verursacht durch Hyphen, Konidiophoren mit hyalinen Phialiden und aus ihnen gebildeten kleinen Sporen, die oft zwei Polkörperchen aufwiesen.

In den Abbildungen 29-33 sind diese verschiedenen Zonen dargestellt.



Abbildungen 29-33: Unterschiedliche Zellmorphologie der Zonen der Kolonien bei *Stachybotrys*-Stämmen (1-5).

Die **Konidiophoren** waren bei allen Stämmen an der Basis oder Hyphen-Seite ein wenig aufgebläht und verjüngten sich zur Spitze hin, wo die Phialiden gebildet wurden, besaßen 2-3 Septen, wobei die letzte, phialidenständige Zelle dunkler gefärbt war als die anderen, die normalerweise eher hyalin waren.

Wie schon erwähnt, waren bei allen Stämmen am 5. Tag eine beginnende **Phialidenbildung** zu beobachten und am 6. Tag konnten die in den verschiedenen Zonen befindlichen Phialiden gefunden werden. In den äußeren Zonen waren hauptsächlich Konidiophoren zu entdecken, die eine Verdickung an ihrem freien Rand zeigten oder bei denen diese erste Phialide gebildet war und die zweite oder weitere in Entstehung waren. In den inneren Zonen, befanden sich mehr Konidiophoren, die schon ihre volle Zahl an Phialiden aufwiesen (vgl. Abbildungen 34-37).

Die Phialiden waren meistens hyalin, außer bei älteren Kulturen, bei denen sie oft schon eine dunkelbraune Farbe angenommen hatten.



Abbildungen 34-36: Phialidenentwicklung



Abbildung 37: Alte Phialide

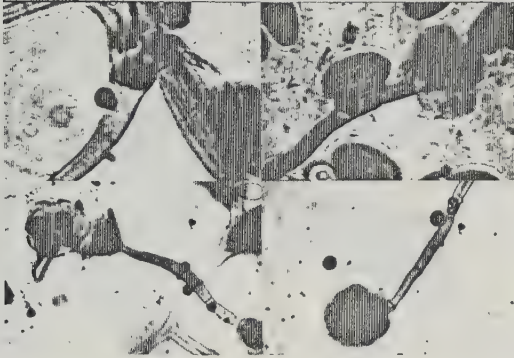
Die **Sporenbildung** wurde zuerst durch Bildung einer rundlichen Ausstülpung an der Spitze der Phialide sichtbar. Diese Ausstülpung gewann an Größe und verwandelte ihre Form zu einem ovalen, am freien Rand sich verjüngenden, immer weiter aus der Phialide herausragenden Gebilde (vgl. Abbildungen 36 und 42).

Diese Bildung war hauptsächlich an den Stellen zu beobachten, an den sich gerade neue Phialiden gebildet hatten, wohingegen an anderen Stellen der Anfang mit Bildung der rundlichen Ausstülpung ausfiel und sofort die verjüngte Spore selbst aus der Phialide herausragte. Es waren dabei hyaline, dünnwandige Sporen mit beginnender Bildung einer rauher Oberfläche und schon hellbraune oder dunkelbraune Konidien mit rauher Oberfläche zu beobachten (vgl. Abbildungen 32, 42 und 43).

Gelegentlich waren an alten Konidiophorenspitzen kleine Ausstülpungen zu beobachten, die sich von den an den jungen Phialiden zu beobachtenden rundlichen Ansätzen dadurch unterschieden, daß sie nicht so abgerundet, sondern eher rosettenförmig ausgebildet waren (vgl. Abbildung 37).

Das oben erwähnte traf für alle untersuchten Stämme zu, wobei

allerdings bei dem Stamm 226/85 noch eine weitere Bildungsweise von Konidien oder konidienähnlichen Gebilden zu beobachten war (vgl. Abbildungen 38-41).



Abbildungen 38-41: Bildung von "runden Gebilde" aus der Konidiophorenwand bei Stamm 226/85.

Es kam dabei an verschiedenen Stellen der Konidiophore zur Entwicklung von zuerst kleinen, dunkelbraunen, runden Gebilden, die an Umfang zunahmen und sich dann von der Konidiophore ablösten. Sie nahmen ungefähr die Größe der normal gebildeten Sporen an, blieben aber während ihrer ganzen Entwicklung rund und dunkelbraun.

Tabelle 61: Sporentypen der Stachybotrys-Stämme auf Czapek Dox-Agar.

Sporentyp	Farbe	Wand	Oberfläche	Polkörperchen	Form
1	hyalin	dünn	glatt	evtl	länglich od rundlich
2	hellbraun	dünn	glatt	evtl	länglich
3	hellbraun mittelbraun	dünn	glatt	evtl	mehr rundlich
4	dunkelbraun	dick	rauh	-	länglich od rundlich

Es lagen insgesamt vier verschieden gefärbte und/oder geformte Sporentypen vor, die von den *Stachybotrys*-Stämmen auf Czapek Dox-Agar gebildet wurden, über die die nachfolgende Tabelle 61 und die Abbildungen 42-45 näher informieren.

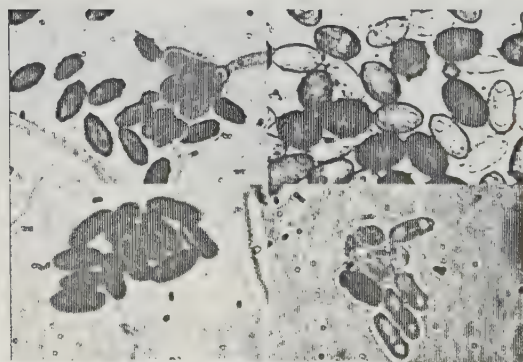


Abbildung 42-45: Verschiedene Sporenformen der *Stachybotrys*-Stämme

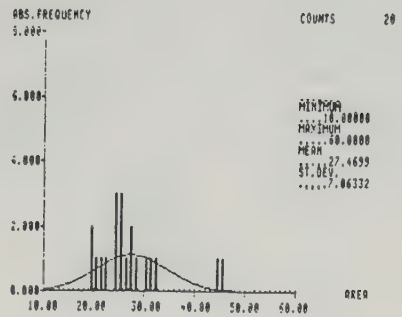
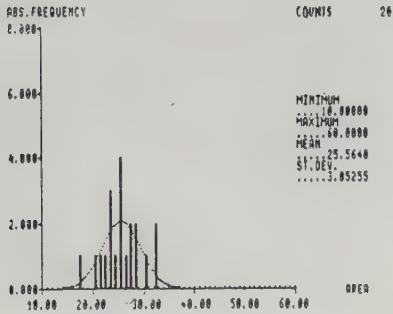
Die Größe und Form der gebildeten Sporen wurden wie unter 1.3.4.2 beschrieben nach einwöchigem Wachstum auf Czapek Dox-Agar vermessen. Sporengröße und Sporenform bei den Referenzstämmen sind aus den Abbildungen 46-48 zu entnehmen. Daraus wird die Größe der Sporen (μm^2) und die Kreis- und Ellipsenähnlichkeit der Sporen ersichtlich. Der Wert 1 bedeutet eine völlige Kreisähnlichkeit bzw. Ellipsenähnlichkeit der vermessenen Strukturen, wobei diese Ähnlichkeiten zu dem Wert 0 hin abnehmen.

Aus diesen Histogrammen wird ersichtlich, daß die Sporengröße der Referenzstämmen im Mittel zwischen 26 und 37 μm^2 lag.

Der Stamm 20a zeigte im Vergleich zu allen anderen Stämmen die kleinste Sporengröße (10-60 μm^2 , im Mittel 26 μm^2). Dabei lag die Sporengröße dieses Stammes sogar unter den von JONG und DAVIS (1976) angegebenen Grenzen für *Stachybotrys atra* (28 μm^2 - 72

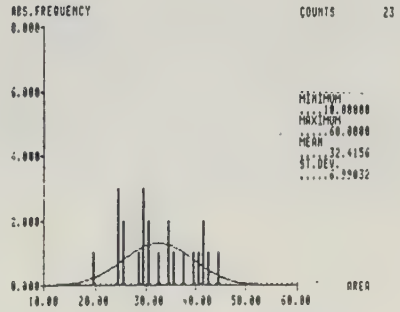
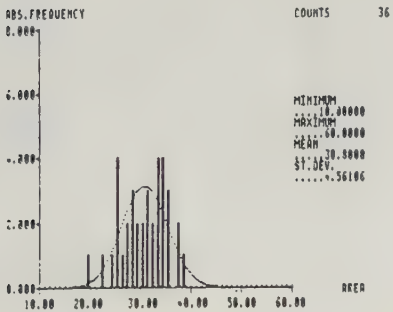
20a

15



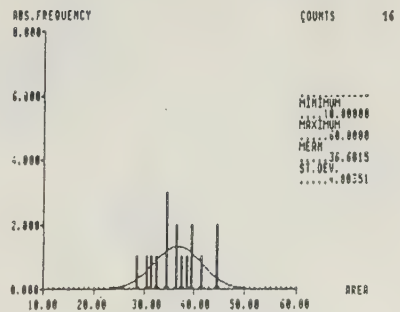
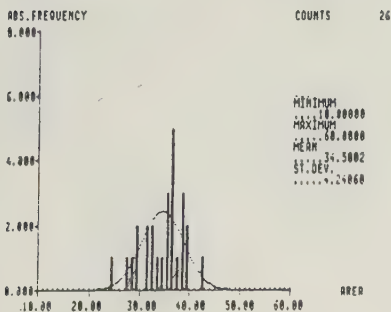
17d

16



10c

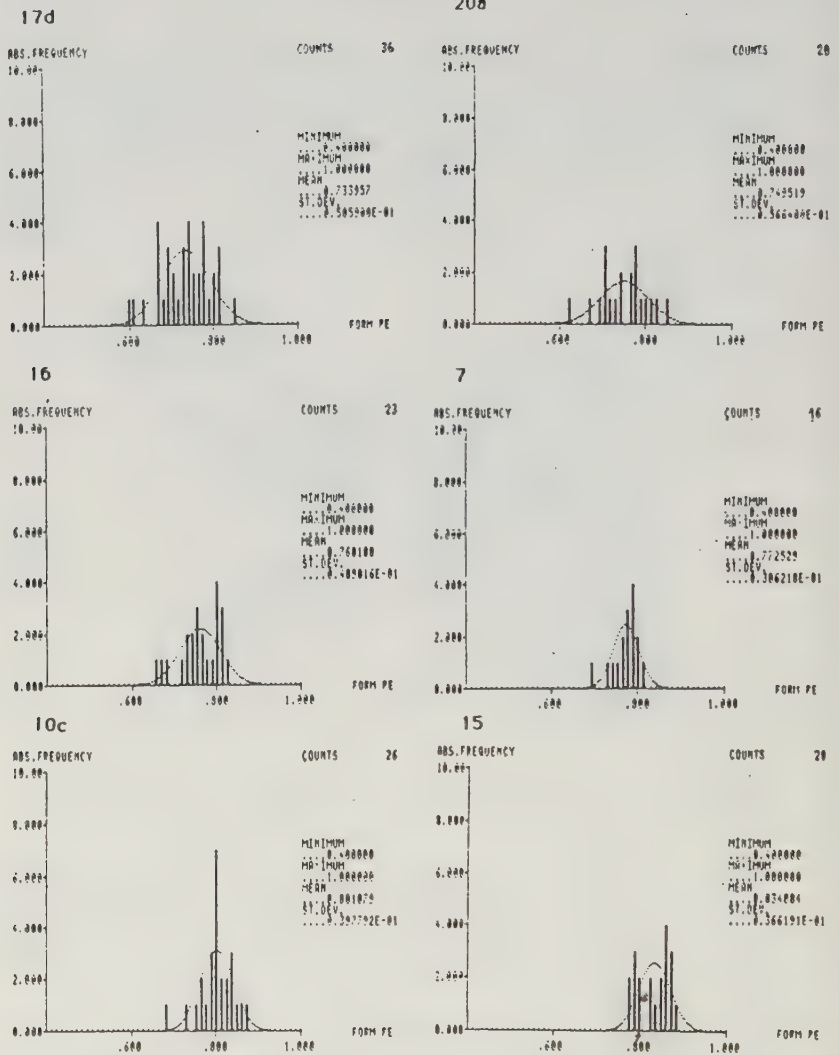
7



counts=Anzahl der gemessenen Sporen
minimum=kleinste gemessene Spore
maximum=größte gemessene Spore

mean=Mittelwert
St. dev=Standardabweichung

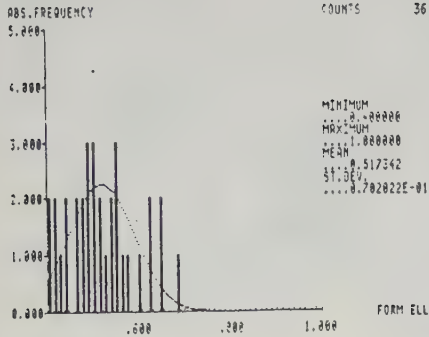
Abbildung 46: Histogramme von Sporen der Referenz-
Stämme (Sporengröße μm^2)



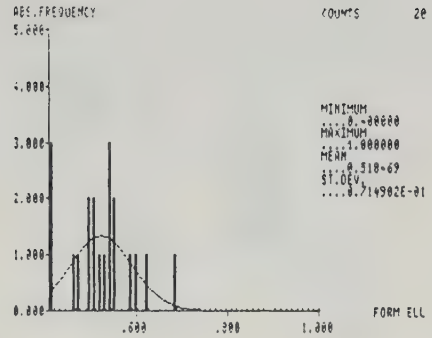
1,0=kreisförmig
0,0=keine Kreisähnlichkeit

Abbildung 47: Histogramme von Sporen der Referenz-Stämme (Kreisähnlichkeit).

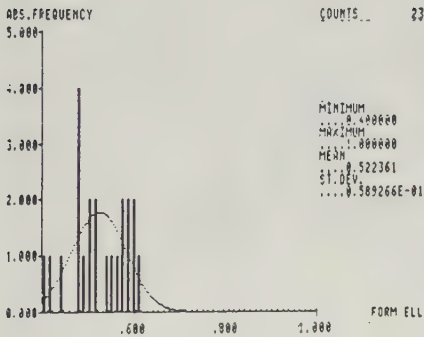
17d



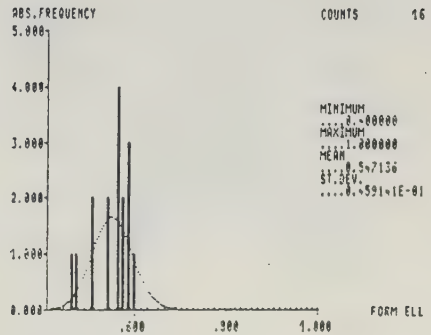
20a



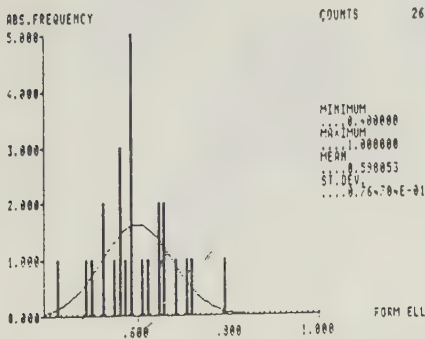
16



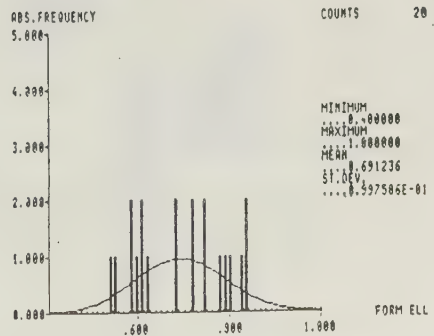
7



10c



15

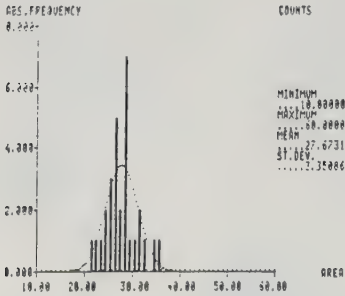


1,0=ellipsenförmig

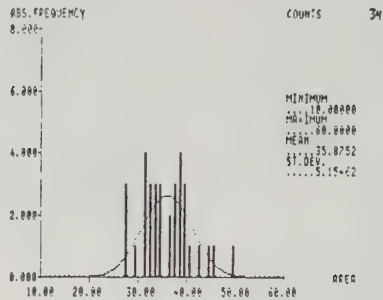
0,00=keine Ellipsenähnlichkeit

Abbildung 48: Histogramme von Sporen der Referenz-
Stämme (Ellipsenähnlichkeit).

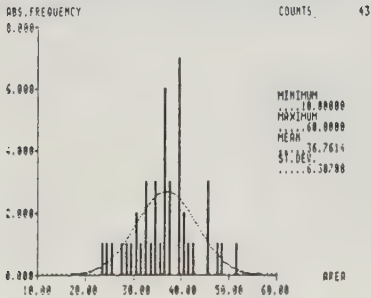
127/84



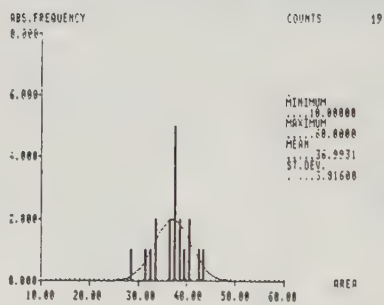
129/84



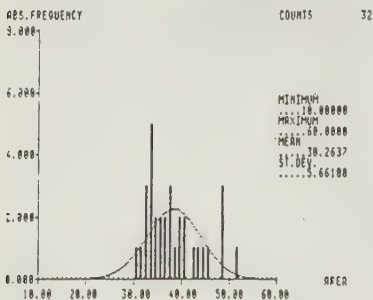
226/85



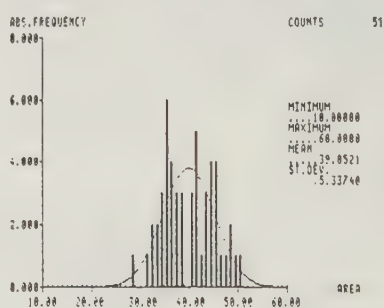
181/85



223/85



225/85

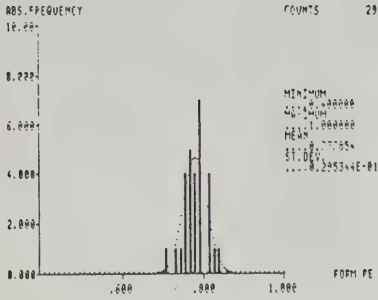


counts=Anzahl der gemessenen Sporen
minimum=kleinste gemessene Spore
maximum=größte gemessene Spore

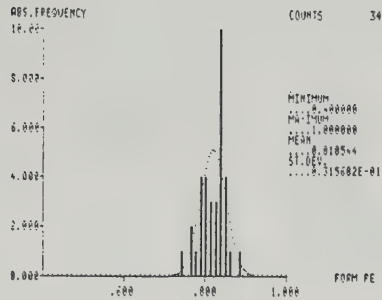
mean=Mittelwert
St.dev=Standardabweichung

Abbildung 49: Histogramme von Sporen der Stachybotrys-Wildstämme (Sporengroße μm^2)

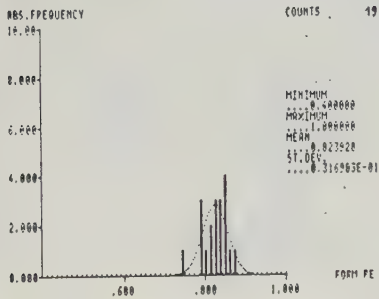
127/84



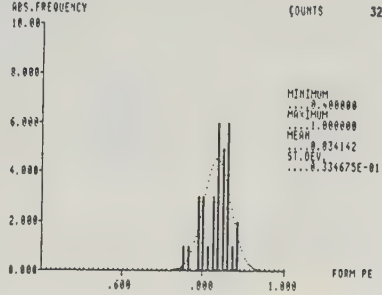
129/84



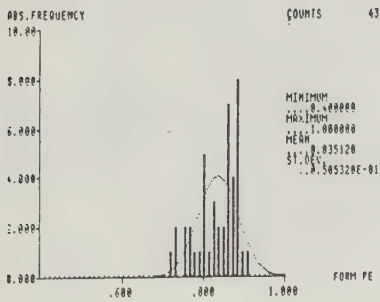
181/84



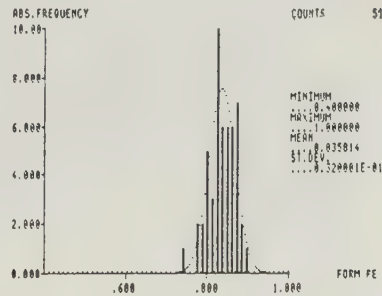
223/85



226/85



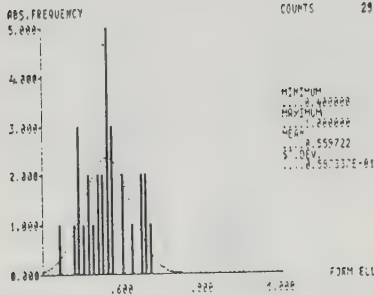
225/85



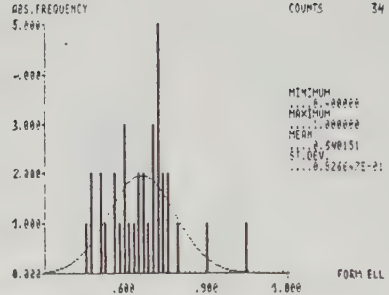
1,0=kreisförmig
0,0=keine Kreisähnlichkeit

Abbildung 50: Histogramme von Sporen der Stachybotrys-Wildstämme (Kreisähnlichkeit)

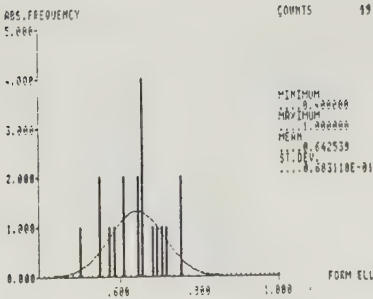
127/84



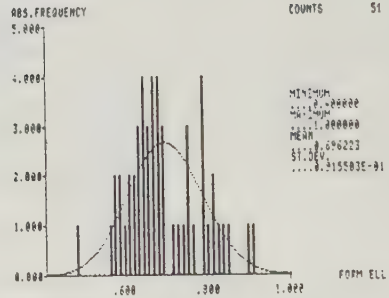
129/84



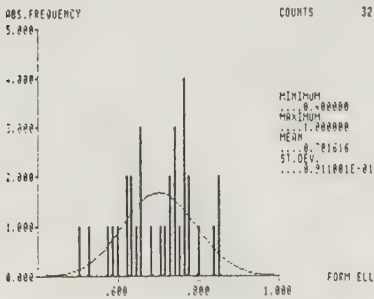
181/84



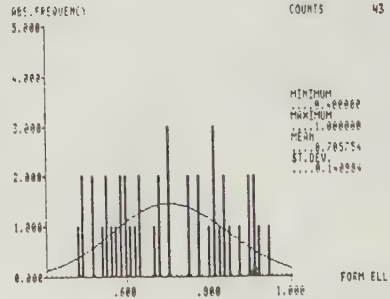
225/85



223/85



226/85



1,0=eilipenförmig
0,00=keine Ellipsenähnlichkeit

Abbildung 51: Histogramme von Sporen der Stachybotrys-Wildstämme (Ellipsenähnlichkeit)

um²). Es soll nicht vergessen werden, daß es sich bei den aller kleinsten vermessenen Flächengrößen um Sporen handelte, die senkrecht zur Betrachtungsebene gelegen waren.

Die Formfaktoren Kreisähnlichkeit und Ellipsenähnlichkeit bei den Referenzstämmen lagen im Mittel zwischen 0,73 und 0,83 und 0,52 und 0,69, also waren die Sporen eher kreisförmig als ellipsenähnlich (vgl. Abbildungen 47, 48 und Tabelle 62).

Die graphischen Darstellungen in den Abbildungen 49-51 geben die Ergebnisse der Vermessungen der Stachybotrys-Wildstämme wieder.

Die Größe der Sporen lag im Mittel zwischen 28 und 40 μm^2 .

Die Kreisähnlichkeit hatte Werte zwischen 0,78 und 0,84, die Ellipsenähnlichkeit lag zwischen 0,56 und 0,71, also waren die Sporen eher kreisförmig als ellipsenähnlich (vgl. Abbildungen 50-51 und Tabelle 62).

Die Tabelle 62 gibt die Werte der Sporengröße und Kreisähnlichkeit aller Stachybotrys-Stämme wieder, um einen Vergleich der Referenzstämmen mit den Wild-Stämmen zu erleichtern.

Tabelle 62: Sporengröße und Kreisähnlichkeit bei den Stachybotrys-Stämmen.

Ref St	Abnehmende Sporengröße μm^2		Wildstämme		Abnehmende Kreisähnlichkeit		Ref St
7	36,60	39,85	225/85	225/85	0,84	0,83	15a
10c	34,50	38,26	223/85	226/85	0,84	0,80	10c
16	32,42	36,99	181/84	223/85	0,83	0,77	7
17d	30,80	36,76	226/85	181/85	0,82	0,76	16
15	27,47	35,88	129/84	129/84	0,82	0,75	20a
20a	25,51	27,67	127/84	127/84	0,78	0,73	17d

Hieraus wird ersichtlich, daß die Wild-Stämme im Mittel größere Sporen bildeten als die Referenzstämmen, außer den Stämmen 127/84 und 129/84, wobei 127/84 die größte Ausnahme in dieser Hinsicht darstellte.

Auch die Tendenz zur Bildung eher kreisförmiger Sporen war bei den Wild-Stämmen größer als bei den Referenzstämmen.

2.4.1.4 Mikromorphologie im Elektronenmikroskop

Auch unter dem Elektronenmikroskop waren die oben beschriebenen, bei der lichtmikroskopischen Untersuchung gefundenen Strukturen wieder zu erkennen, welche in der folgenden Beschreibung anhand von den Abbildungen 52-58 näher erläutert werden.

An der Spitze der jungen Konidiophore ist an einer der Phialiden eine rundliche Ausstülpung zu erkennen, die die Neubildung einer Spore anzeigt. Diese Spore ist die zuerst gebildete Spore, da eine Kontinuität der Phialidenaußenwand trotz dieser Ausstülpung zu finden war. Die hinten gelegene Phialide zeigt eine ältere Sporenentwicklung als die eben beschriebene. Schließlich konnte an der untersten Phialide im Bild eine Eindellung beobachtet werden, die sich nach näherer Betrachtung als eine Öffnung der Phialide zeigte. Somit war bei dieser Phialide eine Bildung von Spore/Sporen vorausgegangen (vgl. Abbildung 52)

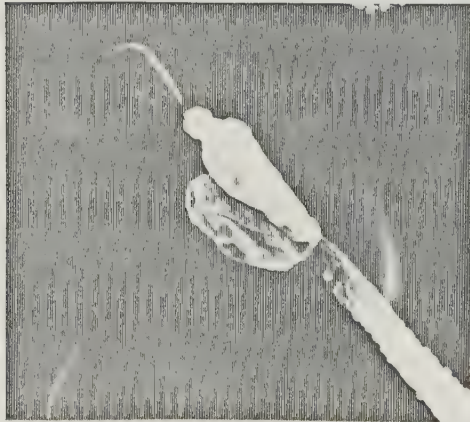


Abbildung 52: Bildung der ersten Sporen

Die Abbildungen 53-55 zeigen die Bildung von weiteren Sporen. Nach der Öffnung der Phialidenwand werden nun weitere Sporen aus der Phialide entlassen. Bei Abbildung 53 sind die Reste der

zerrissenen Wand der Phialide, aus der die Spitze der in Bildung stehenden Spore herausragt als eine zackige Linie zu erkennen. Hier ist die Phialidenwand straff, wogegen die Abbildung 54 eine gefältelte lockere Wandoberfläche zeigt.



Abbildung 53: Bildung weiterer Sporen

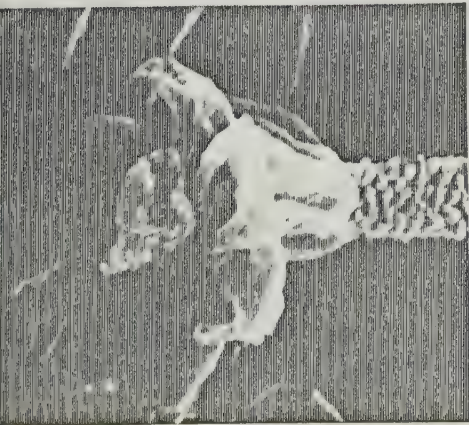


Abbildung 54-55: Bildung weiterer Sporen

Die Abbildungen 56-57 zeigen eine sozusagen in Blüte stehende Konidiophore. Die gebildeten Sporen hängen als eine schleimige Masse an den Phialiden.

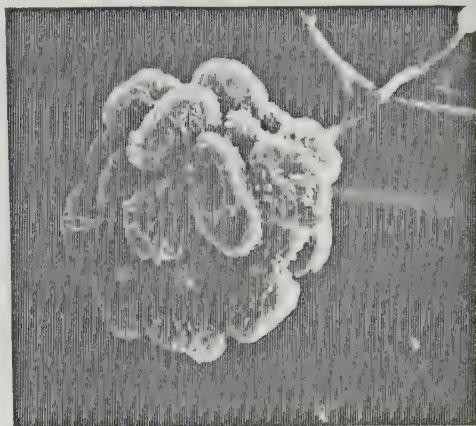
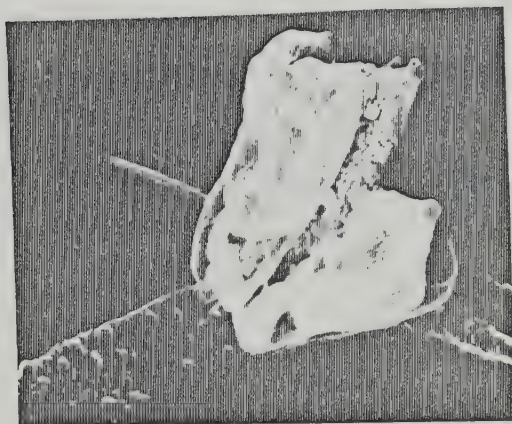


Abbildung 56-57: Höhepunkt der Sporenentwicklung

In der Abbildung 58 sind rosettenförmige Ausstülpungen der Phialidenwand zu erkennen. Diese mit solchen Ausstülpungen versehenen Phialiden stellen die Endstufe der Phialidenentwicklung vor dem Absterben dar.

Elektronenmikroskopisch waren Sporen zu erkennen, die entweder deutlich rauhe, vogelnestartig ausschauende Oberflächen aufwiesen oder Konidien, die eine eher glatte Oberfläche zeigten. Die Sporen waren oval bis rund und besaßen Eindellungen an der äußeren Wand, die ihnen die hauptsächlich blättchenartige Form verliehen. Am häufigsten lagen sie in Gruppen, entweder dicht zusammen geballt (vgl. Abbildung 59) oder lockerer nebeneinander oder aufeinander (vgl. Abbildung 60) gestapelt über den Hyphen, an den Phialiden oder einfach dazwischen.

Bei manchen Stämmen waren kleine Tröpfchen zu sehen, die entweder direkt auf den Sporen lagen oder sich in ihrer Nähe befanden (vgl. Abbildung 60).



Abbildungung 58: Alte Phialide



Abbildungen 59-60: Schleimige Massen von Stachybotrys-Sporen

Die folgenden Abbildungen 61-63 informieren über die Form und Oberfläche der Sporen bei verschiedenen Wild-Stämmen.



Abbildung 61: Glatte Stachybotrys-Spore mit anfänglicher Mantelbildung

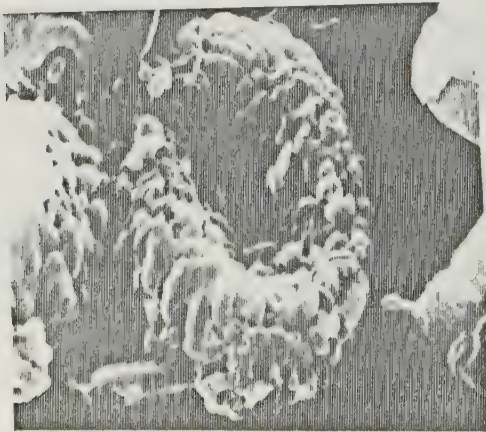


Abbildung 62: Stachybotrys-Spore mit rauher Oberfläche

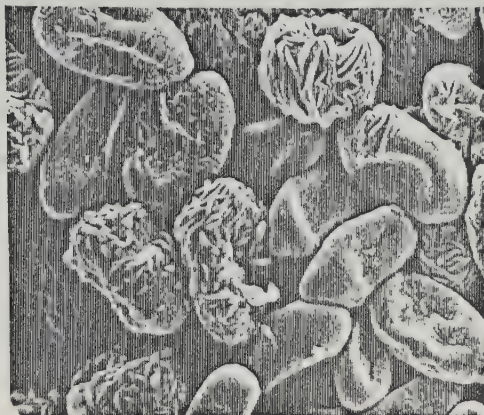


Abbildung 63: Stachybotrys-Sporen mit glatter und rauher Oberfläche

Bei den Stämmen 127/84, 129/84, 181/84, 223/85 und 225/85 handelte es sich um *Stachybotrys atra*. Der Stamm 226/85 konnte wegen der Bildung von runden, dunkelbraunen, glattwandigen Sporen, die aus der Konidiophorenwand hervorgingen, keiner der von JONG und DAVIS (1976) beschriebenen Arten zugeordnet werden.

2.4.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchung

2.4.2.1 Hauttoxizitätstest

Mit allen innerhalb einer Woche auf Hafer gewachsenen Referenzstämmen (7, 10c, 15, 16, 17d und 20a) kam es nach dem Auftragen der Extrakte zu einer Reaktion der Meerschweinchenhaut (vgl. Tabelle 63).

Tabelle 63: Ergebnisse des Hauttoxizitätstestes mit Stachybotrys-Extrakten.

Stamm	24 Std		48 Std		72 Std		120 Std	
	Cz	H	Cz	H	Cz	H	Cz	H
7	-	+	-	++	-	++	-	++
10c	-	+	-	++	-	++	-	++
17d	-	+	-	++	-	++	-	++
15	++	++	++	++++	++	++++	-	++++
16	+	++	++	++++	++	++++	-	++++
20a	++	++	++	+++	++	+++	-	+++
181/84	+		++		++		-	
127/84	+		++		++		-	
129/84	-		+		++		-	
223/85	-		-		-		-	
225/85	-		-		-		-	
226/85	-		-		-		-	

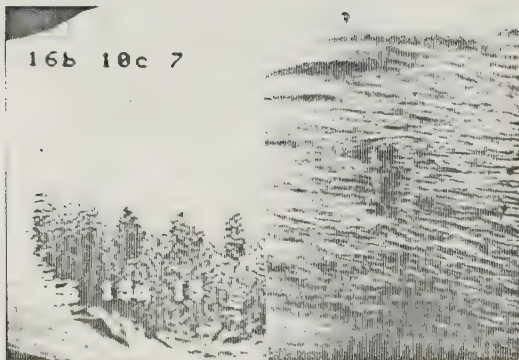


Abbildung 64: Hautreaktionen der Extrakte auf Hafer kultivierter Referenzstämme.

Wegen der außerordentlich heftigen Reaktion der Meerschweinchenhaut auf die auf Hafer gezüchteten Referenzstämme, wurden die Stämme für den Hauttest nur noch auf Czapek-Dox-Agar kultiviert, da ebenfalls eine Reaktion, aber von geringerem Ausmaß, zu beobachten war, wenn auch nicht bei allen Stämmen.

Nach Kultivierung auf **Czapek Dox-Agar** kam es nur bei den finnischen Referenzstämmen 15, 16 und 20a zur einer Reaktion auf der Meerschweinchenhaut.

Die Extrakte der drei anderen Referenzstämme (7, 10c und 17d) lieferten ein negatives Untersuchungsergebnis.

Bei den Wild-Stämmen 127/84, 181/84 und 129/84 kam es zur Reaktion auf der Haut. Die Wild-Stämme 223/85, 225/85 und 226/85 riefen keine Veränderungen im Hauttoxizitätstest hervor, die für eine Toxizität sprachen.

Der Tabelle 63 kann das unterschiedliche Verhalten der Extrakte der Referenzstämme, je nachdem, ob die Pilze auf Hafer oder auf Czapek Dox-Agar gewachsen waren, im Hauttoxizitätstest entnommen werden.

2.4.2.2 Zelltoxizitätstest

Die Tabellen 64-65 geben Auskunft über die Ergebnisse der Prüfung auf Zytotoxizität im Zellkulturtest.

Tabelle 64: Reaktion von sekundären Kaninchennieren-Zellen auf die Extrakte der Referenzstämme.

Stamm	sek Kaninchennierenzellen *
7	-
10c	-
17d	-
15/	++++
16	++++
20a	+++(+)

* Diese Ergebnisse wurden
freundlicher Weise von
Dr E-L HINTIKKA erhalten

Die Ergebnisse, der mit sekundären Kaninchennieren-Zellkulturen (vgl. Tabelle 64 und 65) an der Tiermedizinischen Hochschule in Helsinki durchgeführten Untersuchungen und eigene Befunde, die mit sekundären fetalen Kälberlungen-Zellkulturen ermittelt

Tabelle 65: Ergebnisse der Prüfung der Stachybotrys atra-Extrakte im Zelltoxizitätstest.

Stamm	1-5 Std	1Tage	2Tage	3 Tage	4Tage	5Tage	6Tage	7Tage
129/84 Beobachtungszeitraum								
1Yerd.	++++							
2Yerd.	++	++++						
3Yerd.	++	+++	+++	+++	+++	++++		
4Yerd.	++	++	++	++	++	++	++	++
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
127/84								
1Yerd.	++++							
2Yerd.	++	++++						
3Yerd.	-	++++						
4Yerd.	-	++	++	++	++	++	++	++
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
20a								
1Yerd.	++++							
2Yerd.	++	+++	+++	+++	+++	++++		
3Yerd.	-	++	++	++	+++	++++		
4Yerd.	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
16								
1Yerd.	++++							
2Yerd.	++++							
3Yerd.	+++	+++	+++	+++	+++	++++		
4Yerd.	++	++	++	++	++	++	+++	+++
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
15								
1Yerd.	++++							
2Yerd.	++++	++++						
3Yerd.	++90%	++	++	+++	+++	+++	+++	++++
4Yerd.	++90%	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
181/84								
1Yerd.	++++							
2Yerd.	++++	++++						
3Yerd.	+30%	+50%	++90%	+++	+++	+++(+)	++++	
4Yerd.	+40%	+++	++++					
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 65:

Stamm	1-5 Std.	1Tage	2Tage	3Tage	4Tage	5Tage	6Tage	7Tage
-------	----------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

226/85 Beobachtungszeitraum

1Yerd.	++	++++						
2Yerd.	-	+20%	+30%	++	++80%	+++	+++	+++
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

225/85

1Yerd.	++	++++						
2Yerd.	-	+10%	+30%	+++	+++	+++	+++	+++
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

223/85

1Yerd.	++++							
2Yerd.	-	++	+++	++++				
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

17d

1Yerd.	++++							
2Yerd.	++	+++	++++					
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

10c

1Yerd.	++++							
2Yerd.	++++							
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

7

1Yerd.	++++							
2Yerd.	+20%	+50%	++++					
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

wurden, befanden sich in guter Übereinstimmung, betreffend der Referenzstämme.

Anhand der Ergebnisse können die Referenz- und Wild-Stämme in 5 Gruppen unterschiedlicher Toxizität eingeteilt werden. Es wurde der Bewertung die jeweilige Verdünnung zugrunde gelegt bei der eine Reaktion innerhalb einer Woche zu verzeichnen war (vgl. Tabelle 66).

Tabelle 66: Einteilung der Stachybotrys-Stämme in Toxizitätsgruppen.

Stamm	181	15	16	20a	127	129	7	10c	17d	223	225	226
1Verd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2Verd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3Verd	+	+	+	+	+	+	+					
	+	+	+	+	+	+	+					
	+	+	+	+	+	+	+					
	+	+	+	+	+	+	+					
4Verd	+											
	+	+	+	+								
	+	+	+	+	+	+						
	+	+	+	+	+	+	+					

Abnehmende Toxizität	
Toxizitätsgruppe	Stamm
1	181/84
2	15 16 20a
3	127/84 129/84
4	7 10c 17d 223/85
5	225/85 226/85

Nach dieser Einteilung erwies sich der Stamm 181/84 bei dem Zellkulturtest am toxischsten (Gruppe 1). Dieser Extrakt erwies sich noch in der 4. Verdünnung stark toxisch (++++). Bei dieser Verdünnung zeigten die Referenzstämme 15, 16 und 20a nur noch +++ Reaktion, also zählten somit zur Gruppe 2, die Stämme 127/84 und 129/84 mit ++ Reaktion zur Gruppe 3. Bei allen anderen Stachybotrys-stämmen kam es in der vierten und dritten Verdünnung des Extraktes zu keiner Reaktion.

In der 2. Verdünnung der Extrakte zeigten alle anderen außer 225/85 und 226/85, die mit +++ einzustufen waren, eine völlige Entartung der Zellkulturen (++++). Somit waren die Stämme 7, 10c, 17d und 223/85 der Gruppe 4 zuzuordnen; die Extrakte der Stämme 225/85 und 226/85 waren am geringsten toxisch für die BEL-Zellkulturen und gehörten somit zur Gruppe 5 (vgl. Tabelle 66).

Es zeigte sich, daß der Zelltoxizitätstest empfindlicher ist als der Hauttoxizitätstest, der keine solche Abstufung zuließ. Beim Zelltoxizitätstest reagierten alle Stämme trotz kleiner Mengen (äquivalent) der Rohtoxin/Zellkultur Röhrchen, beim Hauttoxizitätstest aber nicht immer.

Die Toxizität der verschiedenen Stachybotrys-Stämme im Zell- und Hauttoxizitätstest zeigten weitgehende Übereinstimmung. Die nach dem Zelltoxizitätstest zur Gruppe 4 und 5 gehörigen Stachybotrys-Stämme zeigten keine Reaktion im Hauttoxizitätstest. Bei den Stämmen der Gruppe 3 kam es zu Reaktionen an der Meerschweinchenrückenhaut und zugleich zur höchsten Zytotoxizität im Zellkulturtest (vgl. Tabelle 67).

2.4.2.3 Ergebnisse des Mäusetoxizitätstests

Da, wie berichtet, in einer Pferdehaltung Tiere verendeten, wurde ergänzend der Mäusetoxizitätstest durchgeführt. Dabei führte die i.p. Injektion der Extrakte 223/85 und 225/85 zu keinen charakteristischen Krankheitserscheinungen. Dagegen löste die i.p. Injektion der Probe 226/85 einen starken Tremor der Maus kurz nach der Injektion (3 Minuten) aus. Nach 10 Minuten p.i. kam es zu Apathie und Lähmungserscheinungen, die bis zu 1 Stunden p.i. anhielten.

Tabelle 67 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Prüfung der Stachybotrys-Extrakte im Zellkulturtest

Stamm	Zeit Std	Hauttoxizitäts-test	Zytotoxizität im BCL-Zellkulturtest					Toxizitätsgruppen
			1Verd	2Verd	3Verd	4Verd	5Verd	
181/84	24	+	++++	++++	+	+++	-	1
	48	++			++	++++	-	
	72	++			+++		-	
	120	+			+++		-	
15	24	++	++++	++++	++	++	-	2
	48				++	++	-	
	72				+++	+++	-	
	120				+++	+++	-	
16	24	+	++++	++++	+++	++	-	
	48	++			+++	++	-	
	72	++			+++	++	-	
	120	+			+++	++	-	
20a	24	++	++++	++++	++++	++	-	
	48	++				++	-	
	72	++				++	-	
	120	+				++	-	
127/84	24	+	++++	++++	++++	++	-	
	48	++				++	-	
	72	+				++	-	
	120	-				++	-	
129/84	24	-	++++	++++	+++	++	-	3
	48	+			+++	++	-	
	72	++			+++	++	-	
	120	+			+++	++	-	
7	24	-	++++	+	-	-	-	4
	48	-		++++	-	-	-	
	72	-			-	-	-	
	120	-			-	-	-	
10c	24	-	++++	++++	-	-	-	
	48	-			-	-	-	
	72	-			-	-	-	
	120	-			-	-	-	
17d	24	-	++++	+++	-	-	-	
	48	-		++++	-	-	-	
	72	-			-	-	-	
	120	-			-	-	-	
223/85	24	-	++++	++	-	-	-	
	48	-		+++	-	-	-	
	72	-		++++	-	-	-	
	120	-		-	-	-	-	
225/85	24	-	++++	+	-	-	-	5
	50	-		+	-	-	-	
	72	-		+++	-	-	-	
	120	-		+++	-	-	-	
226/85	24	-	++++	+	-	-	-	
	50	-		+	-	-	-	
	72	-		++	-	-	-	
	120	-		++	-	-	-	

Bei dem Fütterungsversuch mit den kontaminierten Pellets (223/85) wurde das Futter mit gutem Appetit während der ganzen 5-tägigen Versuchsdauer gefressen, es waren bei den Versuchstieren auch keine klinischen Symptome einer Vergiftung feststellbar.

2.5 Gattung Alternaria

Die Tabelle 68 gibt über die, für die ergänzenden Prüfungen gewählten Alternaria-Stämme Auskunft.

Tabelle 68: Alternaria-Stämme und ihre Herkunft.

Stamm	Substrat	Anzuchtmedium	Subkultivierungs- medium
4HZ	Hafer	Zellulose-Agar+ Filterpapier	Czapek Dox-Agar
255	Hafer	vgl 132	
7/85	Roggen	vgl 132	
226/85	Stroh	Czapek Dox Agar + Filterpapier	
129/84H	Haare	Sabouraud- Glucose-Agar	
696/85H	Krallen- horn (Hund)	Sabouraud- Glucose-Agar	
703/85H	Haare, Schup- pen (Hund)	Sabouraud- Glucose-Agar	
706/85H	Hautgeschab- sel (Hund)	Sabouraud- Glucose-Agar	
711/85H	Hautgeschab- sel (Katze)	Sabouraud- Glucose-Agar	
814/85H	Haare	Sabouraud Glucose-Agar	

2.5.1 Ergebnisse der mykologischen Untersuchung

2.5.1.1 Bestimmung der Keimzahl nach Kulturabschwemmung

Die Tabelle 69 gibt die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung zur

Beurteilung der Wachstumsintensität nach ein- und zweiwöchiger Kultivierung auf Czapek Dox-Agar wieder.

Tabelle 69: Keimzahlen der *Alternaria*-Stämme nach ein- und zwei-wöchigem Wachstum auf Czapek dox-Agar bei Zimmertemperatur.

Stamm	KBE nach 1-wöchiger Kultur	KBE nach 2-wöchiger Kultur
4HZ	$4,0 \times 10^2 / \text{ml}$	$1,2 \times 10^4 / \text{ml}$
255	$9,0 \times 10^3 / \text{ml}$	$8,0 \times 10^4 / \text{ml}$
7/85	$5,0 \times 10^2 / \text{ml}$	$2,2 \times 10^3 / \text{ml}$
226/85	$5,0 \times 10^7 / \text{ml}$	$6,0 \times 10^7 / \text{ml}$
129/84H	$4,0 \times 10^4 / \text{ml}$	$1,2 \times 10^5 / \text{ml}$
696/85H	$1,7 \times 10^5 / \text{ml}$	$7,0 \times 10^4 / \text{ml}$
703/85H	$5,0 \times 10^3 / \text{ml}$	$6,0 \times 10^4 / \text{ml}$
706/85H	$1,2 \times 10^3 / \text{ml}$	$9,0 \times 10^2 / \text{ml}$
711/85H	$4,0 \times 10^4 / \text{ml}$	$1,3 \times 10^4 / \text{ml}$
814/85H	$5,0 \times 10^4 / \text{ml}$	$5,0 \times 10^5 / \text{ml}$

KBE = Kolonienbildende Einheiten

Bei *Alternaria*en kam es bei den Sporensuspensionen, die 1 und 2 Wochen auf Czapek Dox-Schrägagar gewachsen waren, zu Unterschieden von einem bis zwei Zehnerpotenzen. Dabei bildeten die Stämme 4HZ, 129/84H, 255, 7/85, 703/85H und 814/85H mehr keimungsfähige Einheiten nach zwei Wochen als nach einer Woche, die Stämme 696/85H und 706/85H dagegen weniger nach zwei Wochen und schließlich der Stamm 711/85H ebenso viele zu den beiden Untersuchungszeitpunkten.

2.5.1.2 Makromorphologie

Auf Filterpapier wuchsen die *Alternaria*stämme durch Bildung von schwarzen Flecken, die auf ersten Blick an das Verhalten der *Stachybotrys*-Stämme erinnerte.

Alle *Alternaria*-Stämme wuchsen auf Czapek Dox-Agar erst weiß und relativ spärlich. Langsam begann die, der Oberfläche abgewandte

Seite Farbe anzunehmen und von hellbraun, beige bis dunkelbraun schwarz variierte. Die Oberfläche behielt allerdings noch länger die weiße oder helle Farbe und zeigte später stärkere Farbveränderungen. Die Kulturen nahmen im Alter an Dicke zu und stellten von lockerem samtartigem Wachstum um auf die Bildung von Kolonien mit filziger Oberfläche; bei manchen Stämmen zeigte sich Wachstum in gelblich grünlichen Schattierungen (vgl. Abbildung 65). Die Stämme 814/85H und 129/84H wichen davon ab, indem sie von Anfang an ein pulvriges, gelblich rötlich braunes Wachstum zeigten und bei ihnen im Alter keine dicken filzigen Kolonien gebildet wurden.

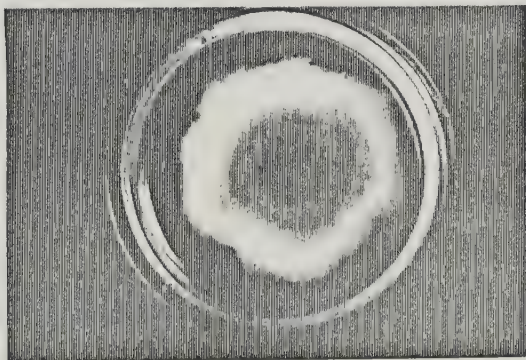


Abbildung 65: Kolonienbildung des Stammes 706 (8. Tag) auf Czapek Dox-Agar.

2.5.1.3 Mikromorphologie im Lichtmikroskop

Über die mikroskopischen Daten informiert die Tabelle 70.

Bei den im Dunklen gehaltenen und bei Zimmertemperatur gewachsenen *Alternaria*-Stämmen dauerte es normalerweise länger als bei den *Stachybotrys*-Stämmen, bis es zur Sporulation kam.

Noch am 6. Tag waren bei den Stämmen 711/85H, 255, 7/85 und 4HZ keine neuen Sporen zu finden, sondern nur einzelne alte oder gerade in Keimung sich befindende. Da es nach SODERHALL et.al. (1978) und HAGGBLOM (1979) im Dunklen zur besseren Toxinbildung kommen soll (Alternariol und Alternariolmonomethylether), wurden keine Versuche unternommen um die Sporulation zu verbessern. Die mykologischen Untersuchungen wurden unter den gleichen Bedingungen vorgenommen, unter denen die Stämme für die Toxinbildung gehalten worden waren.

Die Sporenkeimung erfolgte am Ende der Spore als Verlängerung des Schnabels und/oder von einer Zelle aus, die seitlich lag.

Zur Sporenbildung kam es in der üblichen Art und Weise am Ende der Konidiophoren oder die Sporen entwickelten sich aus Sporen, wie der Abbildung 66 entnommen werden kann.

Die Konidiophoren waren erst hyalin, am 5. bzw. 6. Tag braun gefärbt, am freien Ende ein wenig verdickt und bildeten bei den meisten Stämmen Narben (1-mehrere). (vgl. Abbildungen 66-67 und Tabelle 70)



Abbildung 66: Junge Konidiophore



Abbildung 67: Konidiophore mit Narben

Die Entwicklung der neuen Konidien aus Sporen erfolgte entweder vom Schnabel aus, wobei sich erst eine rundliche Ausstülpung an ihm bildete, die dann begann in die Länge zu wachsen (vgl. Abbildung 68), oder es bildete sich eine kleine Konidiophore aus einer seitlich liegenden Zelle, aus der dann die neue Spore gebildet wurde (vgl. Abbildungen 69-70). Durch diese seitliche Sporenbildung an den Konidien kam es zu Verzweigungen bei der Bildung von Sporenketten.

Die Sporen in Abbildung waren zuerst glatt und oval geformt und bildeten Querwände, die dann normalerweise durch longitudinale oder schiefe Wände noch weiter unterteilt wurden (vgl. Abbildung 71).



Abbildung 68: Bildung von Konidien aus dem Schnabel



Abbildungen 69-70: Bildung von Sporen aus der Seitenwand einer Spore.

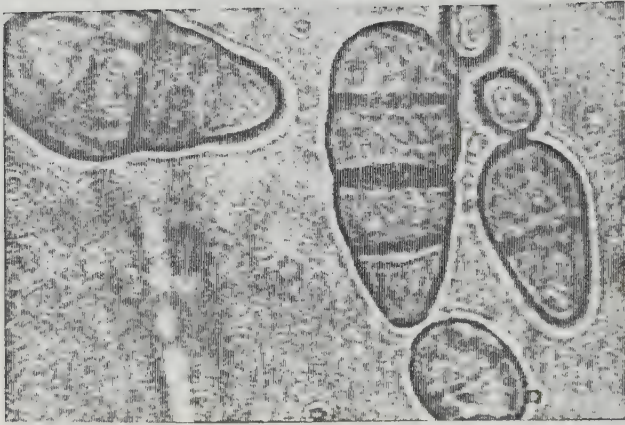


Abbildung 71: Sporenbildung

Die Form der Sporen variierte sehr, wobei länglich keilartige bis fast runde mit Übergangsformen dazwischen zu finden waren (vgl. Tabelle 70 und Abbildungen 68-72)

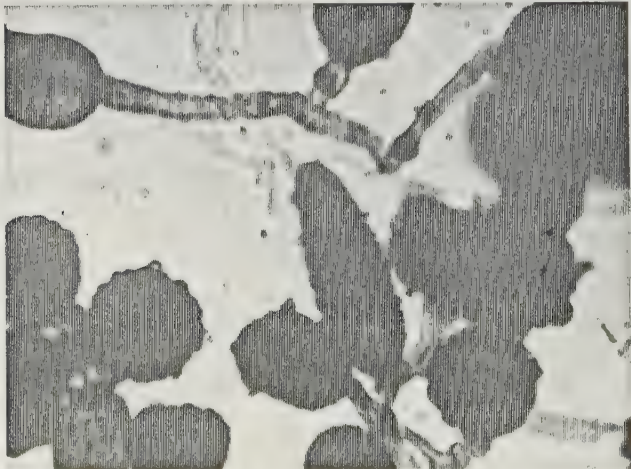


Abbildung 72: Variationsbreite der Sporen von Stamm 814/85H

2.5.1.4 Mikromorphologie im Elektronenmikroskop

Rasterelektronenmikroskopisch erwiesen sich die, im Lichtmikroskop als Zellwände anzusprechenden Gebilde als Zellwlle mit zahlreichen Eindellungen (vgl. Abbildungen 70, 71, 74-77). Obwohl von außen nicht sicher festzustellen war, ob es sich dabei um einzelne Zellen handelte, konnten die Gebilde als Zellen angesprochen werden, denn CAMPBELL (1969) nahm nach elektronenmikroskopischer Untersuchung von *Alternaria brassicola* eine solche Definition vor. Die Bildung der Sporen, die Kettenbildung und die verschiedenen Sporenformen werden anhand einiger Abbildungen (73-79) näher erläutert.

Abbildung 73 zeigt eine junge Spore, bei der es noch nicht zur Bildung von Quervnden gekommen ist.



Abbildung 73: Spore in der Entwicklung

Abbildung 74 zeigt eine reife Spore. Abbildung 75 stellt eine reife Spore dar, an dessen Schnabel eine Ausstülpung zu beobachten ist, die eine neue Spore in der Entstehung darstellt.



Abbildung 74: Reife Spore

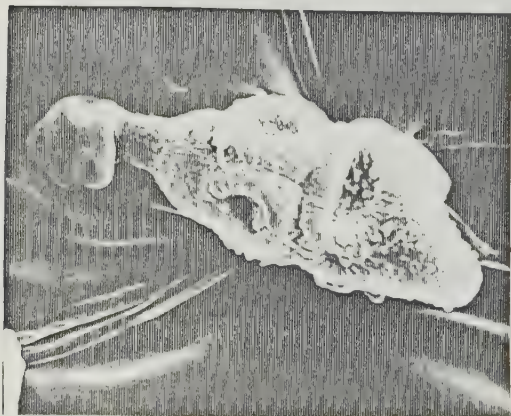


Abbildung 75: Reife Spore, an deren Schnabel eine neue Spore gebildet wird.

Abbildung 76 zeigt Sporen, von denen eine noch in der Entwicklung steht und eine glatte Wand aufweist (226/85). Die Abbildung 77 zeigt die durch den Stamm gebildeten langen, verzweigten Ketten von Sporen.



Abbildung 76: Weitere Sporenbildung an der Sporenkette

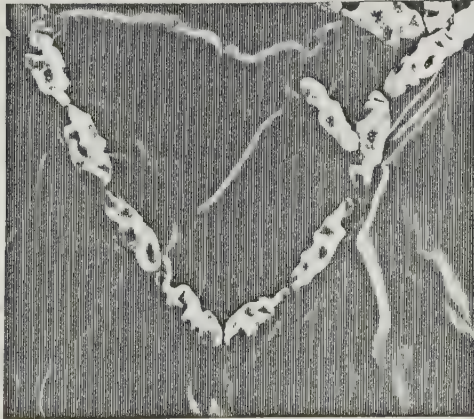


Abbildung 77: Wiedergabe langer, verzweigter Sporenketten (226/85)

Der Stamm 814/85H zeigte die stärkste Variabilität in den Sporenformen. Die Abbildungen 78-79 zeigen drei dieser unterschiedlichen Formationen: Rundliche Sporen, die bei älteren Kulturen reichlich zu finden waren, die für Alternarien typischen länglichen, gedellten Sporen und sehr lange, nicht gedellte Sporen, die nur ausnahmsweise auftraten.



Abbildung 78: Sporenviefalt des Stammes 814/85H

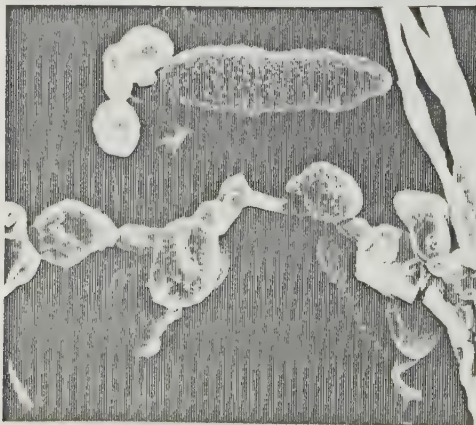


Abbildung 80: Sporenviefalt des Stammes 814/85H.

2.5.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchung

2.5.2.1 Hauttoxizitätstest

Tabelle 71 gibt die Ergebnisse des mit den *Alternaria*-Extrakten durchgeführten Hauttoxizitätstests wieder (vgl. 1.4.2, 1.4.3 und 1.4.4.1 im Teil C).

Tabelle 71: Ergebnisse der Prüfung der *Alternaria*-Extrakte auf Hauttoxizität.

<i>Alternaria</i> Stamm	24 Std.	48 Std.	72 Std.	120 Std.
4HZ	-	-	-	-
255	-	-	-	-
7/85	-	-	-	-
226/85	-	-	-	-
129/84H	-	-	-	-
696/85H	-	-	-	-
703/85H	-	-	-	-
706/85H	-	-	-	-
711/85H	-	-	-	-
814/85H	-	-	-	-

Keiner der untersuchten *Alternaria*-Stämme bildete hauttoxische Stoffe, denn die Tests an der Meerschweinchenhaut verliefen alle negativ.

2.5.2.2 Zelltoxizitätstest

Aus der Tabelle 72 gehen die Veränderungen der Zellkulturen, die durch die *Alternaria*-Extrakte hervorgerufen wurden, hervor (vgl. 1.4.2, 1.4.3 und 1.4.4.2).

Es erfolgte wiederum eine Zuordnung der Stämme nach ihrer Toxizität zu verschiedenen Gruppen, welche der Tabelle 72 entnommen werden kann.

Tabelle 72: Ergebnisse der Prüfung der Alternaria-Extrakte im Zelltoxizitätstest.

Stamm	1-5 Std.	1 Tag	2Tage	3Tage	4Tage	5Tage	6Tage	7Tage
-------	----------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

814/85 Beobachtungszeitraum

1Yerd.	+20%	++++						
2Yerd.	+5%	+++	++++					
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

711/85

1Yerd.	++++							
2Yerd.	-	++++						
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

706/85

1Yerd.	+++	++++						
2Yerd.	-	+++	+++	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++(+)	++++
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

H4Z

1Yerd.	++++							
2Yerd.	+20%	+++	++++					
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 72:

129/H

1Yerd.	-	++	++	++	+++	++++		
2Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

7/85

1Yerd.	+20%	++++						
2Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

226/85

1Yerd.	++++							
2Yerd.	+10%	+40%	+40%	+50%	+50%	+50%	+50%	+50%
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

703/85

1Yerd.	++++							
2Yerd.	+50%	+70%	+++80%	+++	+++	+++	+++	+++
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

255

1Yerd.	+	++++						
2Yerd.	-	+++40%	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

696/85

1Yerd.	++++							
2Yerd.	-	+++	+++	++++				
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 73: Einteilung der *Alternaria*-Stämme in Toxizitätsgruppen.

4HZ 706 711 814 696 255 703 226 7 129										
1Verd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2Verd	+	+	+	+	+					
	+	+	+	+	+	+	+			
	+	+	+	+	+	+	+	+		
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

abnehmende Toxizität	
Toxizitätsgruppe	Stamm
1	711/85H 4HZ 814/85H 706/85H 696/85H
2	255 703/85H
3	226/85
4	7/85 129/84H

Bei den *Alternaria*-Stämmen kam es zu toxischen Erscheinungen nur in der 1. und 2. Verdünnung der Extrakte, was mit der Reaktion im Hauttoxizitätstest übereinstimmte (vgl. Stämme der Gattung *Stachybotrys* und Tabelle 74).

Tabelle 74: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Prüfung der *Alternaria*-Extrakte im Hauttoxizitätstest und im Zelltoxizitätstest.

Stamm	Zeit Std	Hauttoxizitätstest	Zytotoxizität im BEL-Zellkulturtest					Toxizitätsgruppe
			1Verd	2Verd	3Verd	4Verd	5Verd	
711/85H	24	-	++++	++++	-	-	-	1
	48	-			-	-	-	
	72	-			-	-	-	
	120	-			-	-	-	
4HZ	24	-	++++	+++	-	-	-	
	48	-		++++	-	-	-	
	72	-			-	-	-	
	120	-			-	-	-	
814/85H	24	-	++++	+++	-	-	-	
	48	-		++++	-	-	-	
	72	-			-	-	-	
	120	-			-	-	-	
706/85H	24	-	++++	+++	-	-	-	
	48	-		+++	-	-	-	
	72	-		++++	-	-	-	
	120	-			-	-	-	
696/85H	24	-	++++	+++	-	-	-	
	48	-		+++	-	-	-	
	72	-		++++	-	-	-	
	120	-			-	-	-	
255	24	-	++++	+++	-	-	-	2
	48	-		+++	-	-	-	
	72	-		+++	-	-	-	
	120	-		+++	-	-	-	
703/85H	24	-	++++	+	-	-	-	
	48	-		+++	-	-	-	
	72	-		+++	-	-	-	
	120	-		+++	-	-	-	
226/85	24	-	++++	+	-	-	-	3
	48	-		+	-	-	-	
	72	-		+	-	-	-	
	120	-		+	-	-	-	
7/85	24	-	++++	-	-	-	-	4
	48	-		-	-	-	-	
	72	-		-	-	-	-	
	120	-		-	-	-	-	
129/84H	24	-	++	-	-	-	-	
	48	-	++	-	-	-	-	
	72	-	++	-	-	-	-	
	120	-	+++	-	-	-	-	

2.6 Gattung *Trichothecium*

7,84 % der untersuchten Futtermittelproben (102) waren mit *Trichothecien* kontaminiert und zwei Stämme konnten aus der Körperoberfläche von Tieren isoliert werden.

Die Tabelle 75 gibt über die zur weiteren Untersuchung gewählten *Trichothecium*-Stämme nähere Auskunft.

Tabelle 75: Herkunft und Anzucht der *Trichothecium*-Stämme.

Stamm	Substrat	Anzuchtmedium	Subkultivierungsmedium
H1	Hafer	Filterpapier vgl. I.3.2	Czapek Dox-Agar
H2	Hafer	Zellulose-Agar +Filterpapier	
H3	Hafer	Zellulose-Agar +Filterpapier	
H4	Hafer	Zellulose-Agar +Filterpapier	
34/85	Gerste	Czapek Dox-Agar +Filterpapier	
S1	Stroh	Filterpapier vgl. I.3.2	
225/85	Heu	Czapek Dox-Agar +Filterpapier	
179/H	Haare	Sabouraud-Glu- cose-Agar	
702/85H	Haare	Sabouraud-Glu- cose-Agar	

Hierzu sei erwähnt, daß außer bei den Stämmen S1 und H1 ein Wachstum nur im Falle des direkten Auflegens von Körnern auf Zellulose-Agar bzw. Czapek Dox-agar, der mit Filterpapier abgedeckt wurde, erfolgt war.

Die *Trichothecien* aus Hautgeschabsel und Haaren zeigten stattdessen Wachstum auf Sabouraud-Glucose-Agar und wurden dann, wie

alle anderen Stämme, auf Czapek Dox-Agar subkultiviert.

2.6.1 Ergebnisse der mykologischen Untersuchung

2.6.1.1 Bestimmung der Keimzahl nach Kulturabschwemmung

Die Tabelle 76 gibt die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung zur Beurteilung der Wachstumsintensität nach ein- und zweiwöchiger Kultivierung auf Czapek Dox-Agar wieder. Es bestand kein wesentlicher Unterschied in der Keimzahl nach 1 bzw. 2 Wochen.

Tabelle 76: Keimzahlen der Trichothecium-Stämme nach ein- und zweiwöchigem Wachstum auf Czapek Dox-Agar bei Zimmertemperatur.

Stamm	KBE nach 1-wöchiger Kultur	KBE nach 2-wöchiger Kultur
H1	$7,0 \times 10^5 / \text{ml}$	$6,0 \times 10^5 / \text{ml}$
H2	$2,6 \times 10^5 / \text{ml}$	$2,0 \times 10^5 / \text{ml}$
H3	$2,6 \times 10^5 / \text{ml}$	$6,0 \times 10^5 / \text{ml}$
H4	$2,3 \times 10^6 / \text{ml}$	$7,0 \times 10^6 / \text{ml}$
34/85	$1,5 \times 10^6 / \text{ml}$	$2,5 \times 10^6 / \text{ml}$
S1	$7,5 \times 10^5 / \text{ml}$	$8,0 \times 10^5 / \text{ml}$
225/85	$1,0 \times 10^6 / \text{ml}$	$3,0 \times 10^6 / \text{ml}$
179/H	$1,9 \times 10^6 / \text{ml}$	$4,0 \times 10^6 / \text{ml}$
702/85H	$1,1 \times 10^6 / \text{ml}$	$1,0 \times 10^6 / \text{ml}$

KBE = Kolonienbildende Einheiten

2.6.1.2 Makromorphologie

Auf gemahlenem Hafer bildeten Trichothecien ein staubiges, rosa gefärbtes Lager (vgl. Abbildung 80).

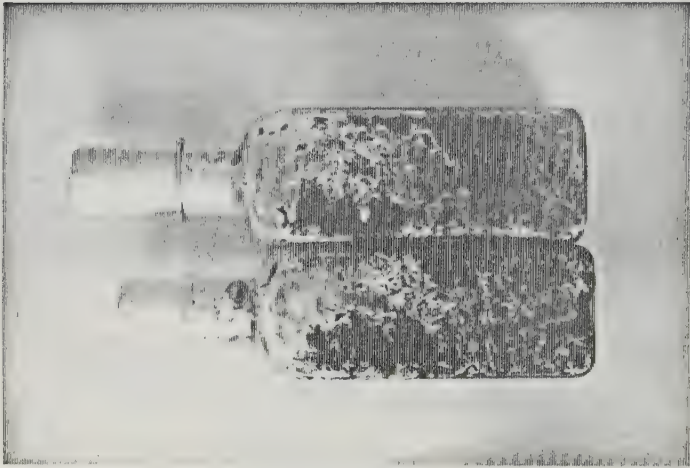


Abbildung 80: Wachstum von Trichothecien auf gemahlenem Hafer

Alle Trichothecium-Stämme wuchsen zunächst auf Czapek Dox-Agar in Kolonien mit weiß bis rosaner Farbe, das Rosa verstärkte sich, und mit Altern der Kulturen trat ein gelbrosa Farbton in den Vordergrund. Es kam durch unterschiedliches Wachstum bei den Stämmen 15/11 und H4 zur Zonenbildung (vgl. Abbildung 81). Die anderen Stämme bildeten Kolonien mit abgegrenztem sternartigem Grundriß (vgl. Abbildung 82) oder Lager mit diffuser Verteilung auf dem Czapek Dox-Agar (vgl. Abbildung 83).

Die Oberfläche der Kolonien war bei allen Stämmen pulverig und staubte leicht bei Erschütterung.



Abbildungen 81-83: Wachstum von *Trichothecium*-Stämmen auf Czapek Dox-Agar.

2.6.1.3 Mikromorphologie im Lichtmikroskop

Eine Sporenkeimung war bei *Trichothecien* schon am 2. und 3.Tag zu beobachten. Nach 3-4 Tagen waren sporenbildende Konidiophoren zu beobachten, wobei die Hyphen, Konidiophoren und Sporen hyalin waren. An darauffolgenden Tagen gab es Massen von Sporen.

Bei der Sporenbildung kam es zunächst zu einer Anschwellung am Gipfelpunkt der Konidiophore. Diese Anschwellung nahm an Größe zu und zeigte die Gestalt eines länglichen Tropfens. Diese erste tropfenartige Spore blieb in der Regel in der Nähe der Konidiophore liegen und es folgte die Bildung einer Septe, die die Zelle unterteilte. Es war dabei zu beobachten, daß die nächste Spore sich sogleich neben der anderen zu entwickeln begann. Dabei waren die beiden spitz auslaufenden Enden aufeinander gerichtet. (vgl. Abbildung 84).

Die Bildung der weiteren Sporen erfolgte in gleicher Weise und

fürhte zur Entstehung von Sporenmassen, wobei die Sporen mit ihren sich verjüngenden Enden stets einander zugewendet waren, während die stumpfen Enden in alle Himmelsrichtungen zeigten. Abbildung 85 zeigt dieses bei Stamm S1, bei dem diese Anordnung der Sporen und die Bildung von "Ketten" im Laktophenolblaupräparat sehr deutlich zum Vorschein kam.



Abbildung 84: Sporenbildung

Abbildung 86 zeigt Trichothecium-Sporen, wie sie bei den Laktophenolblaupräparaten (auf Czapek Dox-Agar kultiviert) öfters vorkamen. Bei den reifen Sporen war eine deutliche Zweiteilung zu erkennen, wobei die ovale Spore an der einen Seite ein stumpfes Ende zeigte, an der anderen Seite spitz auslief.

Über die Größe und Form der Sporen informieren die Histogramme (vgl. Abbildungen 87-89). Aus diesen Histogrammen wird ersichtlich, daß die Sporengröße der Trichothecium-Stämme zwischen (im Mittel) $94,3$ und $143,4 \text{ } \mu\text{m}^2$ lag. Dieses stimmt mit den Angaben von TUBAKI (1954; zit. RIFAI und COOKE, 1966) für Trichothecium roseum-Stämme überein.

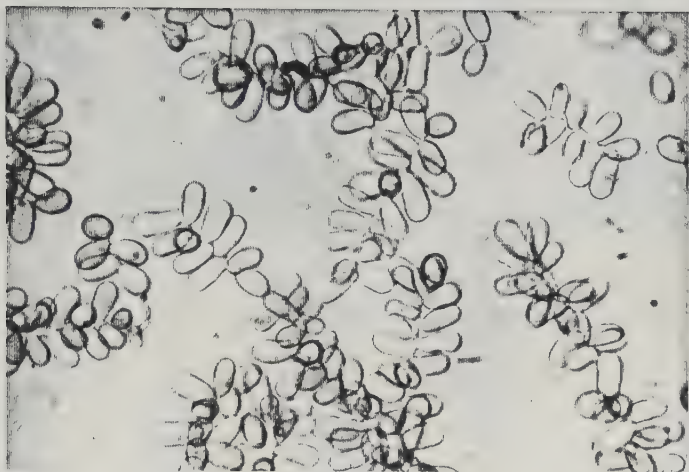


Abbildung 85: "Sporenkettenbildung"

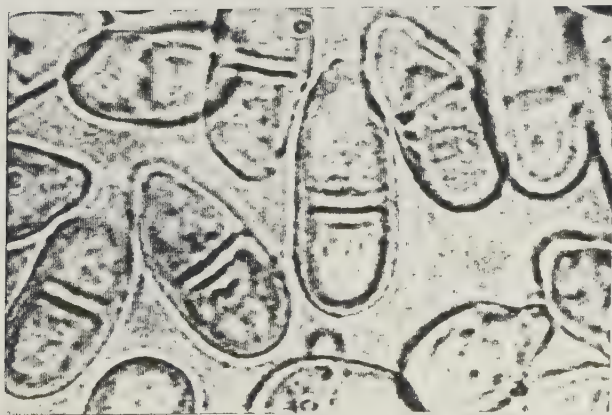


Abbildung 86: Trichotheciumsporen

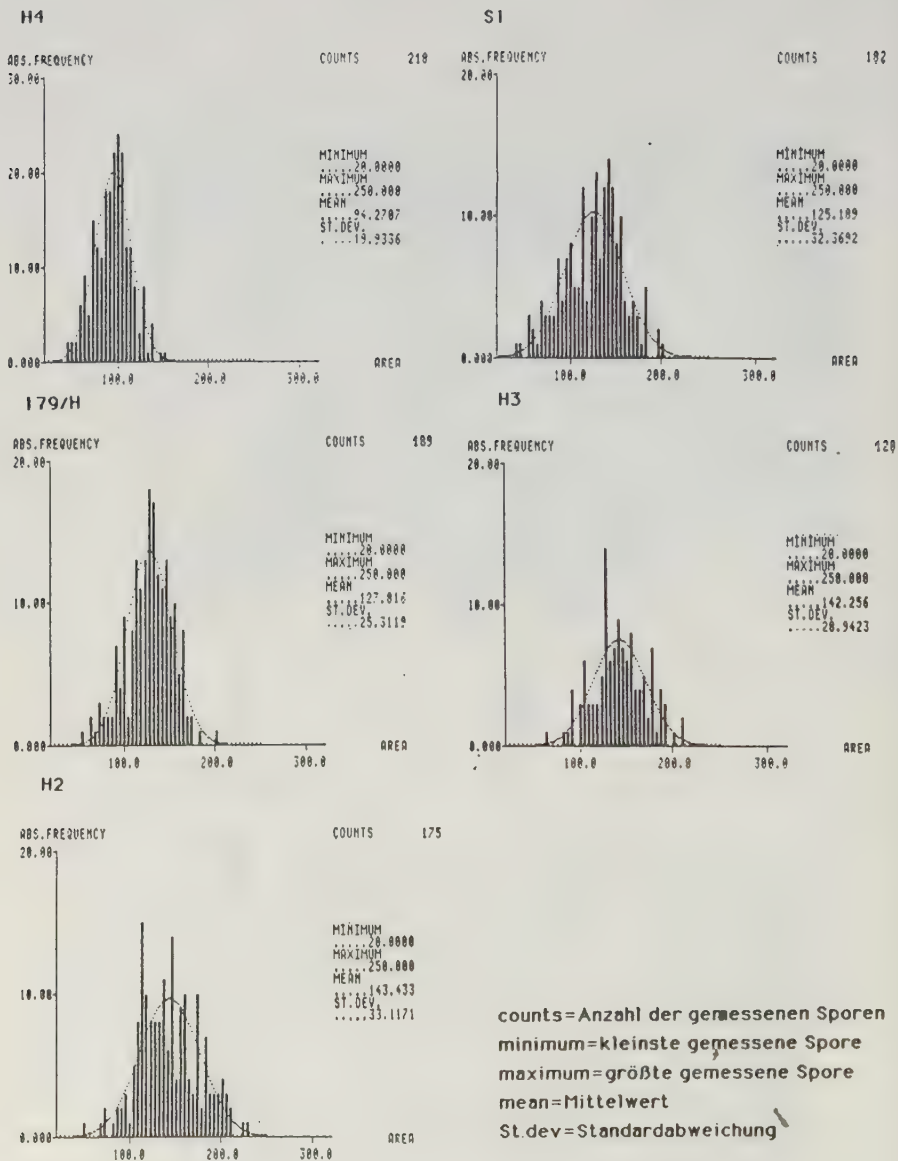
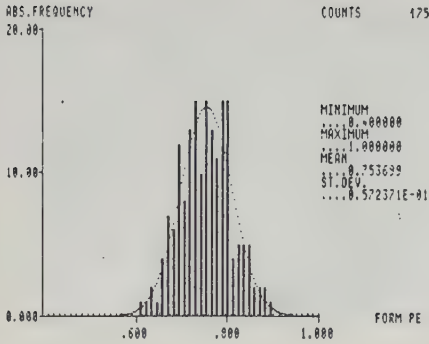
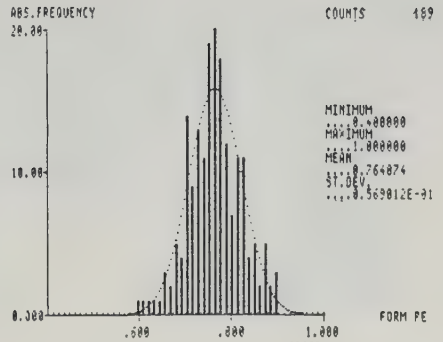


Abbildung 87: Histogramme von Sporen der Trichothecium-Stämme (Sporengröße)

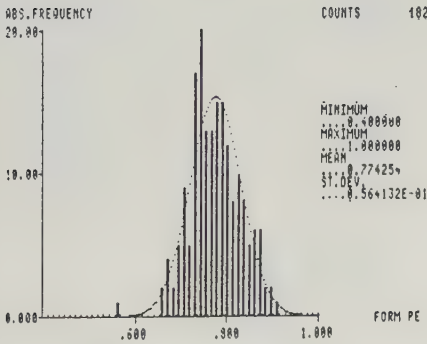
H2



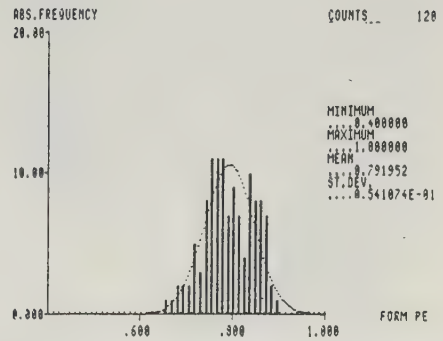
179H



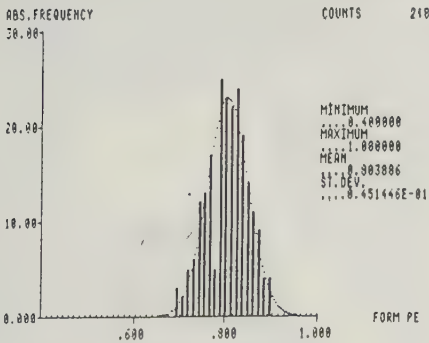
S1



H3



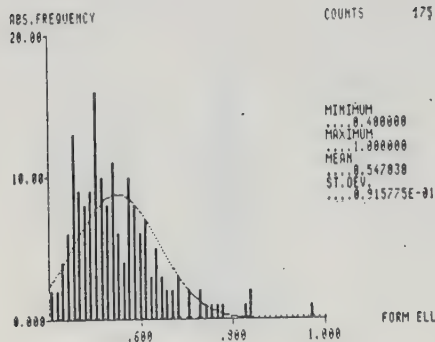
H4



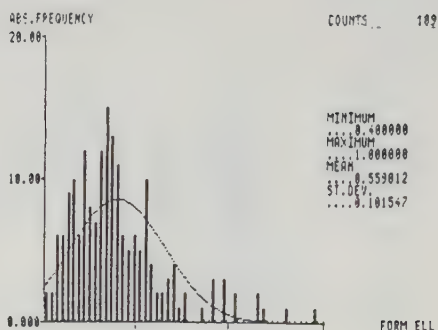
1,0=kreisförmig
0,0=keine Kreisähnlichkeit

Abbildung 88: Histogramme von Sporen der Trichothecium-Stämme (Kreisähnlichkeit)

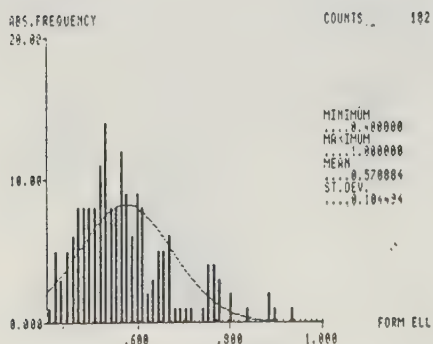
H2



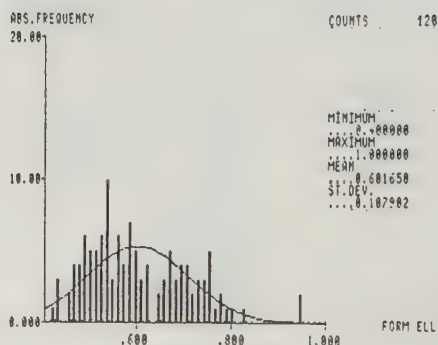
179/H



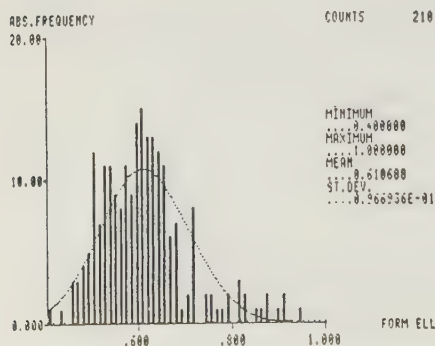
S1



H3



H4



1,0=ellipsenförmig
0,00=keine Ellipsenähnlichkeit

Abbildung 89: Histogramme von Sporen der Trichothecium-Stämme (Ellipsenähnlichkeit)

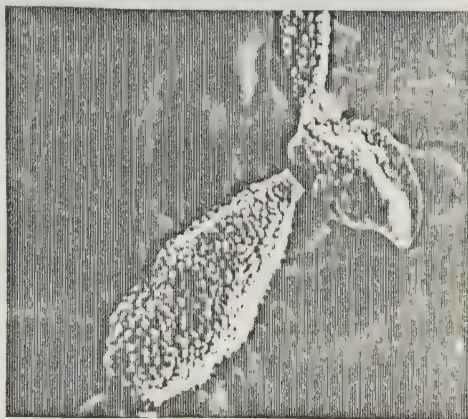
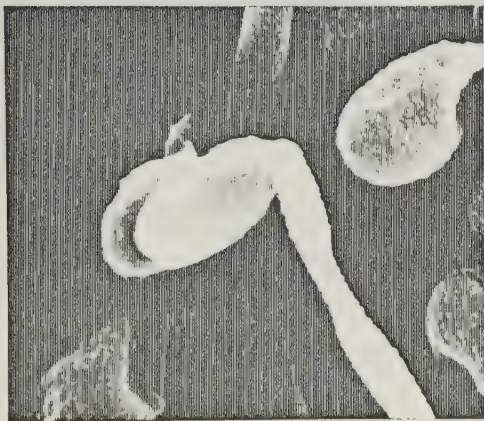
Die Kreisähnlichkeit der Sporen hatte Werte zwischen 0,75 und 0,80, die Ellipsenähnlichkeit zwischen 0,55 und 0,61. Somit sind die *Trichothecium*-Sporen abgerundete, nicht ellipsenförmige, längliche Körper.

Auch für die *Trichothecium*-Stämme H1 und 34/85 trafen diese Werte zu.

Alle *Trichothecium*-Stämme waren der Spezies *Trichothecium roseum* zuzuordnen.

2.6.1.4 Mikromorphologie im Elektronenmikroskop

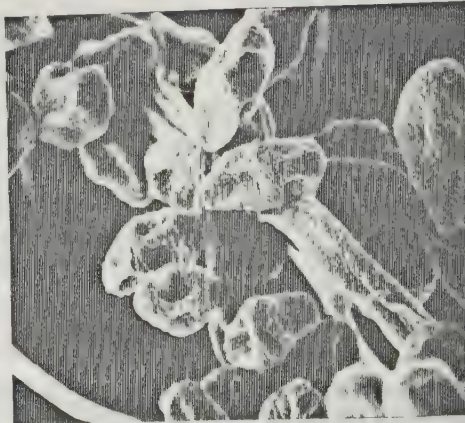
Die Abbildungen 90-91 geben die Sporenentwicklung wieder. Abbildung 90 zeigt die Entwicklung der ersten Spore. In Abbildung 91 schnürt sich die zuerst gebildete Spore von der Konidiophore ab und eine zweite Konidie bildet sich seitlich unterhalb von ihr. Die Sporen zeigen bei diesen Stadien der Entwicklung keine Fältelung in der äußeren Wand.



Abbildungen 90-91: Sporenbildung

In den Abbildungen 92-93 kann die Anordnung der Sporen genauer betrachtet werden. Die Sporen hängen wie an einer Schnur, in jede Himmelsrichtung zeigend, aneinander. Das verbindende Element war dünner als die sie umlagernden Hyphen.

Die Sporen zeigen Eindellungen und Erhebungen in der äußeren Wand. Eine querliegende Septe teilt die Sporen in einen an der Spitze abgerundeten und einen sich zur Spitze hin verjüngenden Teil. Diese waren zusätzlich noch von longitudinalen Strukturen weiter unterteilt (vgl. Abbildungen 92-93).



Abbildungen 92-93: "Kettenbildung" der Trichothecium-Sporen

2.6.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchung

2.6.2.1 Hauttoxizitätstest

In Tabelle 77 werden die Ergebnisse der Prüfung der Trichothecium-Extrakte im Hauttoxizitätstest zusammengestellt.

Tabelle 77: Ergebnisse der Prüfung der Trichothecium-Extrakte im Hauttoxizitätstest.

Stamm	24 Std	48 Std	72 Std	120 Std
H1	+	+	-	-
H2	+	+	+	-
H3	-	+	+	-
H4	-	+	+	-
34/85	+	+	+	-
S1	-	-	-	-
225/85	-	-	-	-
179/H	+	+	+	-
702/85H	-	-	-	-

2.6.2.2 Zelltoxizitätstest

Tabelle 78 informiert über die Ergebnisse der Prüfung der Trichothecium-Extrakte im Zelltoxizitätstest.

Tabelle 79 gibt Einteilung der Trichothecium roseum-Stämme nach verschiedenen Toxizitätsgruppen wieder.

Die Trichothecien gliedern sich in 5 Gruppen. Da es bei den Stämmen teilweise zu unterschiedlichen Veränderungen in den Parallelansätzen kam, wurde diesem Tatbestand bei der Zuordnung Rechnung getragen.

Bei den Trichothecium roseum-Stämmen kam es nicht zu einer völligen Übereinstimmung des Hauttoxizitätstests mit dem Zelltoxizitätstest. 3 Trichothecium-Stämme zeigten unterschiedliche Reaktionen auf diese beiden Tests. Stamm S1 war nicht toxisch auf der Haut, war aber gemäß dem Zellkulturtest Toxizitätsgruppe 2 zuzuordnen. Die Stämme H4 und H3 ergaben eine positive Reaktion im Hauttoxizitätstest, aufgrund des Zelltoxizitätstests gehörten sie aber zu den am wenigsten toxischen Vertretern (=Gruppe 5; vgl. Tabelle 80).

Tabelle 78: Ergebnisse der Prüfung der Trichothecium-Extrakte im Zelltoxizitätstest.

Stamm	1-5 Std.	1Tag	2Tag	3Tag	4Tag	5Tag	6Tag	7Tag
-------	----------	------	------	------	------	------	------	------

Beobachtungszeitraum

179/H

1Yerd.	+40%	+++	++++					
2Yerd.	+	++	+++	+++	+++	++++		
3Yerd.	-	+10%	+	+	+	2Rö 40% 1Rö+++	2Rö++ 1Rö+++	2Rö++ 1Rö+++
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

15/11

1Yerd.	++++							
2Yerd.	+20%	+20%	+++	+++	+++	++++		
3Yerd.	-	+10%	+20%	+20%	+30%	2Rö++	1Rö ++ 2Rö +	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

H1

1Yerd.	+30%	++++						
2Yerd.	+20%	+20%	+++	++++				
3Yerd.	-	-	+30%	+30%	2Rö30% 1Rö+++	2Rö++ 1Rö+++	1Rö++++ 1Rö+++ 1Rö++	1Rö++++ 1Rö+++ 1Rö++
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

34/85

1Yerd.	+40%	++	+++	++++				
2Yerd.	+30%	++	+++	++++				
3Yerd.	+20%	+20%	+40%	+40%	+40%	2Rö+++ 1Rö++		
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 78:

Stamm	1-5 Std.	1Tage	2Tage	3Tage	4Tage	5Tage	6Tage	7Tage
Beobachtungszeitraum								

H4

1Yerd.	-	++++						
2Yerd.	-	-	++	++	++	++	++	++
3Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

H3

1Yerd.	-	++90%	+++	++++				
2Yerd.	-	++80%	++	++	+++	+++	+++	+++
3Yerd.	-	-	+20%	+40%	+40%	+40%	+40%	+40%
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

702/85

1Yerd.	+++90%	+++	++++					
2Yerd.	+++90%	+++	+++	+++	+++	+++		
3Yerd.	-	-	+20%	+	+	+50%	+50%	+50%
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

225/85

1Yerd.	-	++++	++++					
2Yerd.	-	++++	+++ 2Rö ++++1Rö	+++	+++	+++		
3Yerd.	-	-	+10%	+20%	+20%	+30%	+30%	+40%
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

H2

1Yerd.	-	++90%	+++	++++				
2Yerd.	-	++20%	++	++	++	+++	++++	
3Yerd.	-	-	+10%	+20%	+20%	+20%	+20%	+30%
4Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-
5Yerd.	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 79: Einteilung der Trichothecium-Stämme in Toxizitätsgruppen.

	34	H1	S1	179	H2	225	702	H3	H4
1Verd	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2Verd	+	+	+	+	+	+	+		
	+	+	+	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3Verd	+	+							
	+	+							
	+	+	+	+					
	+	+	+	+	+	+	+	+	

abnehmende Toxizität	
Toxizitätsgruppe	Stamm
1	34/85 H1
2	S1 179/H
3	225/85 702/85H H2
4	H3
5	H4

Tabelle 80: Gegenüberstellung der Befunde der Prüfung der Trichothecium-Extrakte im Hauttoxizitätstest und im Zelltoxizitätstest.

Stamm	Zeit Std	Hauttoxizitätstest	Zytotoxizität im BEL					Toxizitätsgruppe
			1Verd	2Verd	3Verd	4Verd	5Verd	
34/85	24	+	++	++	+	-	-	1
	48	+	+++	+++	+	-	-	
	72	+	++++	++++	+	-	-	
	120	-			+	-	-	
H1	24	+	++++	+	-	-	-	
	48	+		+++	+	-	-	
	72	-		++++	+	-	-	
	120	-		+	+	-	-	
S1	24	-	++++	+	+	-	-	2
	48	-		+++	+	-	-	
	72	-		+++	+	-	-	
	120	-		+++	+	-	-	
179/H	24	-	+++	++	+	-	-	
	48	+	++++	+++	+	-	-	
	72	+		+++	+	-	-	
	120	-		+++	+	-	-	
H2	24	+	++	++	-	-	-	3
	48	+	+++	++	+	-	-	
	72	+	++++	++	+	-	-	
	120	-		++	+	-	-	
225/85	24	-	+++	+++	+	-	-	
	48	-	++++	+++	+	-	-	
	72	-		+++	+	-	-	
	120	-		+++	+	-	-	
702/85H	24	-	+++	+++	-	-	-	4
	48	-	++++	+++	+	-	-	
	72	-		+++	+	-	-	
	120	-		+++	+	-	-	
H3	24	-	++	++	-	-	-	5
	48	+	+++	++	+	-	-	
	72	+	++++	++	+	-	-	
	120	-		+++	+	-	-	
H4	24	-	++++	-	-	-	-	5
	48	+		++	-	-	-	
	72	+		++	-	-	-	
	120	-		++	-	-	-	

2.7 Scedosporium- bzw. Petriellidium-Stamm

2.7.1 Ergebnisse der mykologischen Untersuchung

2.7.1.1 Makromorphologie

Der näher untersuchte *Scedosporium*-Stamm wurde aus einer Haferprobe nach Anzucht auf Filterpapier (vgl. 1.3.2) isoliert; er hatte das Filterpapier an der Stelle, an der er gewachsen war, schwarz gefärbt.

Auch bei diesem Pilz war schon am 3. Tag ein weißer Flaum auf Czapek Dox-Agar zu beobachten; es entwickelte sich daraus eine Art Matte, schnell sich nach allen Seiten ausbreitend, so daß in zwei Wochen die ganze Agarplatte davon bedeckt war. Die Kulturen zeigten im Alter oberseits weißes dickes Luftmyzel, die Unterseite der Kolonie war beige, dunkelbraun bis grau-schwarz verfärbt (vgl. Abbildung 94).

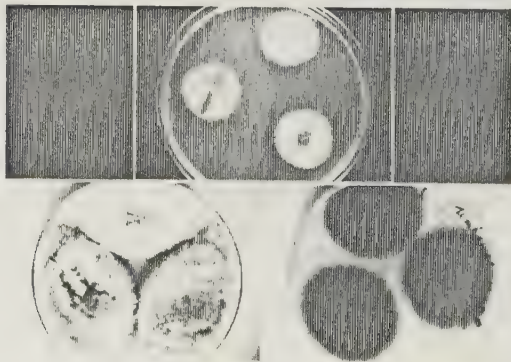


Abbildung 94: Makroskopisches Wachstum des *Scedosporium*-Stammes auf Czapek Dox-Agar

2.7.1.2 Mikromorphologie im Lichtmikroskop

Auf Czapek Dox-Agar waren am 4. Tag mikroskopisch Sporen zu erkennen, die eine ovale Form aufwiesen und hyalin oder hellbraun gefärbt waren. Sie wurden einzeln von den Konidiophoren gebildet und lagen bei Beobachtung im Laktophenolblaupräparat nach ihrer Bildung einzeln oder zu mehreren zwischen den hyalinen Hyphen. Sie hatten eine glatte Oberfläche und waren nur einzellig (vgl. Abbildung 95). Die Größe der Sporen betrug im Mittel $41 \mu\text{m}^2$.

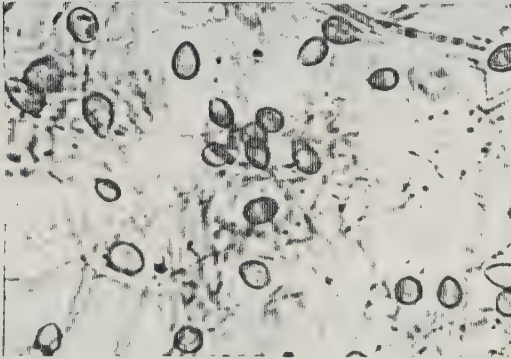


Abbildung 95: Mikromorphologie des *Scedosporium*-Stammes bei Wachstum auf Czapek Dox-Agar

Da von dem Stamm auf Czapek Dox-Agar die perfekte Form gebildet wurde, wäre er eigentlich der Gattung *Petriellidium* zuzuordnen. Es kam zur Bildung erst dicht angeordneter, kleiner, dichter Kugelformen, die an Größe zunahmen und eine dunkelbraune Farbe annahmen. Es waren darunter solche mit an einer Stelle geöffneter Wand zu beobachten (Cleistothecien). Es handelte sich um einen kleinen Spalt, durch den Massen von ovalen bis länglichen, hellbraunen Sporen (Ascosporen) austraten (vgl. Abbildung 96).

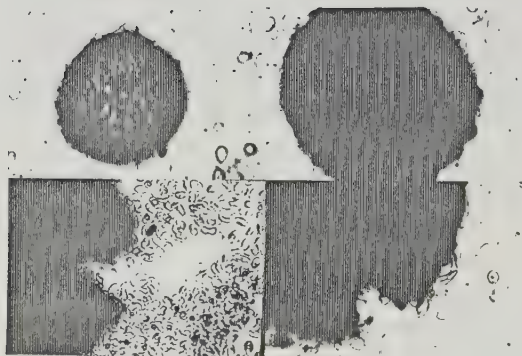


Abbildung 96: Bildung von Cleistothecien und Ascosporen

2.7.1.3 Mikromorphologie im Elektronenmikroskop

Im Elektronenmikroskop wurde eine Verdickung an der Spitze der Konidiophore deutlich, auf dem die, in Bildung begriffene Spore aufsaß. Außer dieser Art von einfacher Verdickung waren auch Konidiophoren zu beobachten, die eine Verengung vor dem stempelartig verdickten Ende zeigten, an dem die gebildeten Sporen hängen.

Bei der einfachen Verdickung war entweder eine oder keine Trennwand zwischen der Spore und der Konidiophore zu entdecken. Die andere Art von Verbindung erinnerte an ein Gelenk, mit einem von der Konidiophore gebildetem Gelenkkopf, in Verbindung stehend mit der "Sporengelenkpfanne" (vgl. Abbildungen 97-98).

Nach Reifung und Abtrennung der Sporen von der Konidiophore zeigten diese entweder eine Narbe entsprechend der "Gelenkpfanne" an einem Ende und verdickten sich keulenförmig zum anderen Ende hin, oder sie wiesen äußerlich nur ein stumpfes, rundes Ende und eine ein wenig verjungte, mit einer geraden Narbe endende Seite auf (vgl. Abbildungen 97-98).



Abbildung 97: Verdickte Konidiophore und Sporen



Abbildung 98: Verdickte Konidiophore und gelenkartige Verbindung zwischen Konidiophore und Spore

Die Sporen selbst zeigten bei den gewählten Vergrößerungen eine glatte Oberfläche, die in Längsrichtung Falten und Eindrücken aufwiesen.

2.7.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

2.7.2.1 Hauttoxizitätstest

Das Scedosporium-Extrakt war toxisch für die Meerschweinchenhaut. Nach 24 Stunden war an der Auftragsstelle starke Rötung und Schwellung zu beobachten. Die Entzündung verstärkte sich innerhalb der nächsten 24 Stunden, danach begann sie wieder abzuklingen. Die Entzündungsstelle war erheblich größer als die Auftragsfläche und zeigte eine glänzende Oberfläche. An dieser Stelle kam es erst nach langer Zeit wieder zum Haarwachstum.

2.7.2.2 Zelltoxizitätstest

Im Zellkulturtest war der Extrakt dagegen nur schwach toxisch. Nur die 1. Verdünnung führte zu Veränderungen, es entstanden Lücken im Zellrasen mit Abkugelungen nach 1-5 Stunden; nach 24 Stunden war er total zerstört (++++). Alle anderen Verdünnungen ergaben keine Unterschiede im Verhalten der Zellen, verglichen mit den Kontrollen innerhalb einer einwöchigen Versuchsdauer (vgl. Tabelle 81).

Tabelle 81: Ergebnisse der Prüfung des Scedosporium-Extraktes im Hauttoxizitätstest und im Zelltoxizitätstest.

Stamm	Zeit Std.	Hauttoxizitätstest	Zytotoxizität im BEL-Zellkulturtest				
			1Verd	2Verd	3Verd	4Verd	5Verd
	24	++	++++	-	-	-	-
	48	+++		-	-	-	-
	72	++		-	-	-	-
	120	++		-	-	-	-

(D) DISKUSSION

Da die untersuchten Futtermittel hauptsächlich mit Lagerpilzen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*, sowie der Ordnung *Mucorales* kontaminiert waren, daneben auch Vertreter der Feldpilze darunter *Cladosporien*, *Alternarien* und *Fusarien* nachzuweisen waren, entsprach der Keimbesatz der von SPICHER (1981) beschriebenen Intermediärflora. Auf Stroh waren häufiger *Alternarien* und *Cephalosporium*-artige Pilze anzutreffen als *Aspergillen* und *Penicillien*. *Mucorales* und *Fusarien*, die höhere Ansprüche an die Substratfeuchte stellen, waren häufiger bei Anzucht auf Sabouraud-Glucose-Agar bzw. Czapek dox-Agar nachweisbar. Das stimmt mit der Beobachtung überein, daß erstere bei der Lagerung der Futtermittel erst hervortreten, wenn andere Pilze wie *Aspergillen* die Voraussetzungen geschaffen haben. Die letzteren sterben häufig ab, wenn die Substratfeuchte bei 18% und darunter beträgt, wie es der Gesetzgeber vorschreibt. Da *Aspergillen*, *Cladosporien*, *Cephalosporium*-artige Pilze, *Scopulariopsis* spp., *Trichothecien* und Vertreter der Gattung *Stachybotrys* sich stattdessen häufiger auf Filterpapier entwickelten, kann daraus der Schluß gezogen werden, daß sie geringere Ansprüche an das Substrat stellen und möglicherweise weniger empfindlich auf eine Reduktion des Wassergehaltes reagieren. Trotz Entnahme der Substratfeuchte konnten auch nach längerer Zeit der Bebrütung bei Zimmertemperatur noch Sporen dieser Pilze lebensfähig angetroffen werden. Der Vorteil der Züchtung auf Filterpapier gegenüber der Kultivierung auf einem dafür geeigneten Agarnährboden kann darin gesehen werden, daß eine weit größere Artenvielfalt erfaßt wird, da das Wachstum langsamer erfolgt. Zu einem Überwuchern wie auf den Agarnährböden kommt es hierbei seltener; allerdings dürfen Cellulose-spaltende Pilze hierbei einen selektiven Vorteil haben. In Fällen, in denen besonderer Wert darauf gelegt wird, auch unterrepräsentierte Arten zu erfassen, um vor allem auch wichtige toxinogene Pilze nicht außer acht zu lassen, sollten, wie die eigenen Untersuchungen gezeigt haben, nach Möglichkeit stets unterschiedliche Substrate zur Anzucht Verwendung finden. Diesem Umstand ist es vermutlich zu verdanken, daß insgesamt sechs Vertreter aus der Gattung *Stachybotrys* isoliert werden konnten. Es überraschte, daß Pilze dieser Gattung nicht nur aus Heu und Stroh gezüchtet werden

konnten, sondern auch aus einem Eiweißkonzentrat und Mischfutter. Der Schwärzepilz von der Wand des Aquariums, in dem Fische verendet waren, ließ sich ebenfalls dieser Gattung zuordnen. Er erwies sich, wie vier der anderen Stämme, als zur Art der *Stachybotrys atra* zugehörig. Nur ein Stamm, nämlich der Stamm 226/85, ließ sich nicht den von JONG und DAVIS (1976) beschriebenen *Stachybotrys*-Arten zuordnen.

Nach MATHUR und SAKHLA (1966) bildete *Stachybotrys atra* var. *microspora* erst ellipsen- oder birnenförmige Sporen, die mit dem Alter kugelförmig wurden. Bei der ersten Kultivierung von *Stachybotrys microspora* zeigte sich später, daß eine Mischkultur mit *Stachybotrys atra* vorlag. Deshalb wurden seinerzeit die kleinen, für *Stachybotrys microspora* typischen und die größeren für *Stachybotrys atra* typischen Sporen nachgewiesen. Die Mikromorphologie des Stammes 226/85 zeigte Übereinstimmung mit der alten Beschreibung und Mischkultur von *Stachybotrys atra* und *Stachybotrys microspora*. Da die runden kleinen Sporen aber bei dem Stamm 226/85 aus der Konidiophorenwand und nicht wie üblich aus den Phialiden gebildet wurden, kann es sich bei dem Stamm nicht wie damals um eine Mischkultur aus *Stachybotrys atra* und *Stachybotrys microspora* handeln.

Morphologisch ähnliche, von ZUCK (1946) beschriebene Isolate, wurden von ihm als Zwischenformen von *Stachybotrys* und *Memnoniella* (Hybrid) aufgefaßt. Er beobachtete auch zwei Sporenformen, von denen die runden Konidien aber in Ketten angeordnet waren, was beim Stamm 226/85 nicht zutraf.

Nach dem Vorhergesagten handelt es sich bei Stamm 226/85 vermutlich um einen Vertreter einer bislang noch nicht beschriebenen Art, der sowohl die für *Stachybotrys atra* typischen aus Phialiden gebildeten Sporen produziert als auch kleine, dunkelbraune Sporen aus der Konidiophorenwand hervorbringt.

Unabhängig von der Artzugehörigkeit erwiesen sich jedoch alle Vertreter der Gattung *Stachybotrys* als toxisch, so daß die *Stachybotryotoxikose* auch hier im Lande eine Rolle spielen dürfte. Sie wird möglicherweise verschiedentlich nicht als solche diagnostiziert, da andere Pilze wie die Fusarien chemisch verwandte Stoffe, die Trichothecene bilden, die in vivo mit den Satratoxinen vergleichbare Wirkungen entfalten. Die Satratoxine übertreffen als makrozyklische Trichothecene die nichtmakrozyklischen Trichothecene der Fusarien und verwandter Pilzarten

wie *Trichothecium* in der Toxizität.

Gegenüber den geprüften Testobjekten erwiesen sich die Extrakte der Referenzstämme als hoch toxisch, wenn sie auf Hafer kultiviert worden waren. Nach Züchtung auf Czapek dox-Agar wurden Abstufungen in der Toxizität festgestellt, vor allem wenn die Extrakte im Zelltoxizitätstest geprüft wurden. Dabei konnten geringe Differenzen in der Sporenmorphologie beobachtet werden, aus denen aber kein eindeutiger Zusammenhang mit Toxizität dieser Stämme gestellt werden konnte auch nicht bei zu Hilfenahme des Elektronenmikroskops. Auch die Wachstumsgeschwindigkeit und die Sporenzahl hatten darauf keinen Einfluß. Allerdings konnten die für die Toxizität verantwortlichen Toxine im einzelnen nicht bestimmt werden, da es für die Satratoxine und auch für andere Toxine der Schwärzepilze noch keine Standards im Handel gibt. Dennoch konnten durch die Tests nicht gänzlich unwesentliche Beobachtungen gemacht werden. Dies trifft im Besonderen für die *Alternaria*-Arten zu. Nur zur Hälfte waren die Stämme aus Stroh isoliert worden; die anderen Stämme aus Material von der Körperoberfläche von Tieren, die zum Vergleich mit in die Prüfung einbezogen wurden. Keiner der Extrakte der zehn geprüften Stämme ergab eine positive Reaktion im Hauttoxizitätstest, dagegen jedoch im Zelltoxizitätstest. Dies steht im Einklang mit den Feststellungen anderer Autoren, wonach *Alternaria*-Arten Dibenzoa-pyrone bilden und von denen aufgrund ihrer von den Trichothecen abweichenden Struktur keine Hautveränderungen zu erwarten waren (WYLLIE und MOREHOUSE, 1977). Aufgrund der großen Variabilität in der Morphologie war eine Zuordnung zu einer bestimmten Art dieser Gattung nicht möglich.

Die *Trichothecium*-Stämme gehörten eindeutig zu einer Species, nämlich *Trichothecium roseum*. Sie wurden deshalb mit in die Prüfung einbezogen, obwohl sie nicht zu Schwärzepilzen oder Dematiaceae gehören, weil diese Species das Trichothecin bilden soll, welches den *Stachybotrys atra*-Toxinen chemisch verwandt ist. Mit drei der getesteten *Trichothecium*-Stämme waren deshalb vermutlich nach Auftragung des Kulturextraktes nicht positive Reaktionen im Hauttoxizitätstest zu beobachten. Da allerdings im Zelltoxizitätstest alle Stämme toxisch waren, sind außer dem bekannten Toxin noch andere Toxine als potentielle Ursache in Betracht zu ziehen.

Beim isolierten *Scedosporium*-Stamm kam es zu einer Reaktion im

Hauttoxizitätstest, die möglicherweise der von LEWIS et.al. (1966) beschriebenen Antigen-Antikörper-Reaktion entsprach. Meer-schweinchen, die mit *Allescheria boydii* infiziert wurden, bildeten Hautantigene nach intradermaler Injektion von Protein- und Polysaccharidfraktionen dieses Pilzes. Es kam nach acht Stunden zu Erythem mit sowohl Protein- als auch Polysaccharidfraktionen. Die Polysaccharidfraktion regte außerdem eine Pustelbildung an, die bei der Proteinfraktion fehlte. Das Erythem, das durch die Polysaccharidreaktion verursacht wurde, schwächte sich nach 24 Stunden ab, wogegen die Proteinfraktion bis 48 Stunden unverändert blieb. Zusätzlich war eine Verhärtung der Haut zu beobachten (LEWIS et.al., 1966).

Es ist anzunehmen, daß die Versuchstiere schon vorher mit diesem Pilz Kontakt hatten durch das Vorkommen in Einstreu und Futter, insbesondere da Extrakte dieses *Scedosporium*-Stammes im Zelltoxizitätstest nur eine sehr geringe Wirkung zeigten.

(E) ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 6 Einstreu- und 96 Futtermittelproben auf den Besatz mit mesophilen Hyphomyceten untersucht. Zur Anzucht der Pilze wurde das Untersuchungsmaterial größtenteils, wie zur Keimzahlbestimmung zunächst verdünnt und danach auf Filterpapier und verschiedentlich auf Sabouraud-Glucose-, Czapek Dox-Agar und Zellulose-Agar verimpft oder in einigen Fällen auch direkt auf die Nährböden aufgebracht. Bei 63 Proben erfolgte eine parallele Beimpfung von dem angefeuchteten Filterpapier und den Agarnährböden. Nach Entwicklung von Kolonien auf den verschiedenen Substraten bei Zimmertemperatur erfolgte aufgrund der Makro- und Mikromorphologie eine Zuordnung der Pilze zu den zwei hauptsächlich mesophile Hyphomyceten umfassenden Ordnungen Moniliales und Mucorales. Pilze der Gattungen *Stachybotrys*, *Alternaria*, *Trichothecium* und *Scedosporium* wurden isoliert und mykologisch sowie toxikologisch näher untersucht. Zum Vergleich wurden Referenzstämme der Art *Stachybotrys atra* und einige Vertreter mit gleicher Gattungszugehörigkeit von der Wand eines Aquariums und von der Körperoberfläche von Tieren mit in die Untersuchung einbezogen.

Die mykologische Untersuchung beinhaltete makroskopische, mikroskopische und elektronenmikroskopische Beobachtungen der ausgewählten Moniliales.

Toxikologisch wurden die Extrakte der auf Czapek Dox-Agar kultivierten Pilzstämme im Hauttoxizitätstest (Meerschweinchenrückenhaut) und Zelltoxizitätstest (BEL-Zellen), in einigen Fällen auch im Mäusetoxizitätstest untersucht.

Folgende Resultate wurden erzielt:

1. Die untersuchten Futtermittel waren zu über 50% mit *Aspergillus* spp. und *Cladosporium* spp., zu 20-40% mit *Penicillium* spp., Mucorales, Cephalosporium-artigen Pilzen, *Alternaria* spp., zu 10-20% mit *Scopulariopsis* spp. und *Fusarium* spp. und schließlich nur mit weniger als 10% mit *Trichothecium* spp., *Stachybotrys* spp. und *Scedosporium* u.a. kontaminiert.

2. Bei Hafer, Weizen, Gerste und Mischfutter bildeten die isolierten *Aspergillus* spp. und *Cladosporium* spp. den relativ

größten Anteil, nur bei **Stroh** traten Alternarien und Cephalosporium-artige Pilze häufiger auf als Aspergillen. Penicilium spp. wuchsen auf allen oben erwähnten Futtermitteln, waren aber auf Stroh nur gering anzutreffen. Mucorales und Cephalosporium-artige Pilze wurden aus allen Futtermitteln mit unterschiedlichen Anteilen isoliert.

Das Mischfutter war mit Alternarien kaum kontaminiert. Bei Gerste war ein Befall mit Alternarien und Fusarien nicht festzustellen. Andere Pilzgattungen traten bei allen Futtermitteln nur in geringen Anteilen auf.

3. Bei Anzucht auf **Filterpapier** wurden Aspergillen, Cladosporien, Cephalosporium-artige Pilze, Scopulariopsis, Trichothecien und Stachybotrys häufiger isoliert als mit **Sabouraud-Glucose/Czapek Dox-Agar**. Im Gegensatz dazu gelang die Anzucht der Penicillien, Mucorales und Fusarien häufiger auf den genannten Agar-Nährböden.

4. Die 32 für die toxikologischen Untersuchungen ausgewählten Stämme variierten in der **Morphologie** teilweise recht beträchtlich, auch wenn sie zur gleichen Art gehörten; eine Beziehung zur Toxinbildung ließ sich auch bei den Stachybotrys atra Stämmen nicht herstellen.

5. Die Extrakte aller 12 Stämme der Gattung Stachybotrys, 6 von 9 Trichothecium-Stämmen und auch der eine Stamm der Gattung Petriellidium erwiesen sich als **hauttoxisch**. Die Extrakte der Stämme der Gattung Alternaria waren dagegen nicht dermatotoxisch, ergaben aber positive Resultate im Zelltoxizitätstest.

6. Sämtliche Stämme aus den vier Gattungen der Moniliales Stachybotrys, Alternaria, Trichothecium und Petriellidium waren nach dem **Zelltoxizitätstest** als Toxinbildner einzustufen. Da die Reaktionen divergierten, wurde angenommen, daß die Stämme verschiedene Toxine in unterschiedlicher Menge bildeten.

7. Die Untersuchungen von Moniliales, die zuweilen in Futtermitteln gegenüber anderen Pilzen unterrepräsentiert sind, bestätigen, daß sich hierunter auch potente Toxinbildner befinden, denen häufig mehr Beachtung geschenkt werden sollte.

OCCURRENCE OF STACHYBOTRYS ATRA AND OTHER TOXIC MONILIALES IN FODDER

(E) SUMMARY

A total of 102 samples (96 fodder and 6 litter) were investigated for the occurrence of mesophilic hyphomycetes. To culture the fungi, samples were first suspended using the method for the determination of germ counts and then transmitted by inoculation on filterpaper and partially also on nutrient agar (Sabouraud-Glucose, Czapek Dox-Agar, Cellulose-Agar). In some cases specimens were directly applied on the nutrient mediums. Sixtythree samples were parallelly inoculated on moist filter paper and nutrient agar. After the growth of colonies on the various substrates at room temperature macro- and micromorphological criteria were used to classify the fungi into two groups, - Moniliales and Mucorales-, which are two orders mainly comprising mesophilic hyphomycetes. Fungi of the genera *Stachybotrys*, *Alternaria*, *Trichothecium* and *Scedosporium* were isolated and more closely investigated mycologically as well as toxicologically. As a comparison, reference strains of *Stachybotrys atra* as well as other representatives of the same genus taken from the wall of an aquarium and from the body surface of animals were included in the investigation.

The mycological investigation comprised macroscopic, microscopic and electron microscopic examinations of the selected Moniliales. The extracts of fungus strains were toxicologically investigated after cultivation on Czapek Dox-Agar using a skin test (dorsal skin of a guinea pig) and cytotoxicity test (BEL cells). In some cases mice toxicity tests were also carried out.

The following results were achieved:

1. Over 50% of the fodder investigated was contaminated by *Aspergillus* spp. and *Cephalosporium* spp.; between 20% and 40% were contaminated with *Penicillium* spp., *Mucorales*, *Cephalosporium*-like fungi and *Alternaria* spp.. *Scopulariopsis* spp. and *Fusarium* spp. were found in 10% to 20% of the samples and less than 10% were contaminated by *Trichothecium* spp., *Stachybotrys* spp., *Scedosporium* and others.

2. In oats, wheat, barely and mixed fodder *Aspergillus* spp. and *Cladosporium* spp. were proportionally most frequently found fungi. However, genus *Alternaria* and *Cephalosporium*-like fungi occurred more frequently in straw than *Aspergillus* spp.. *Penicillium* spp. grew on all the above mentioned fodder, but were found only to a less extent in straw samples. *Mucorales* and *Cephalosporium*-like fungi were isolated from all types of fodder in various numbers. The mixed fodder was hardly contaminated by *Alternaria*. An infestation of barley with *Alternaria* and *Fusaria* could not be established. Other genera only occurred in small quantities in all fodder.

3. *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Cephalosporium*-like fungi, *Scopulariopsis* spp., *Trichothecium* spp. and *Stachybotrys* spp. could be isolated more frequently in cultures on filter paper than in cultures on Sabouraud-Glucose/Czapek Dox-Agar. Contrary to this, the cultivation of *Penicillia*, *Mucorales* and *Fusaria* was more successful using Agar-substrates.

4. The morphology of the 32 strains which were selected for toxicological investigation varied, sometimes considerably, even when they belonged to the same species; a relationship to the formation of toxins could not be established with *Stachybotrys atra* strains.

5. The extracts from all the 12 strains of the genus *Stachybotrys*, six of the nine *Trichothecium* strains as well as the one strain of the genus *Petriellidium* proved to be dermatotoxic. The extracts of the *Alternaria* spp. were found not to be dermatotoxic, but cytotoxic on BEL-cells.

6. According to the cellular toxicity tests, all strains from the four *Moniliales* genera, *Stachybotrys*, *Alternaria*, *Trichothecium* and *Petriellidium*, were classified as toxigenic. Due to the fact that the reactions were diverse, it was assumed that the strains produced different toxins in various quantities.

7. The investigations of *Moniliales*, which are sometimes under-represented in fodder when compared to other fungi, confirm the presence of potent toxigenic fungi and indicate that further observations should be carried out in this field.

(F) LITERATURVERZEICHNIS *

ABDEL - HAFEZ, S. J. J., 1984:

Composition of the fungal flora of four cereal grains in Saudi Arabia.
Mycop , 85, 53 - 57.

ABDEL - HAFEZ, S. I. I., SHOREIT, A. A. M., 1985:

Mycotoxins producing fungi and mycoflora of air-dust from Taif, Saudi Arabia.
Mycop , 92, 65 - 71.

AHMED, S. I., ASAD, F., 1971:

Coprophilous fungi of west Pakistan. Part IV.
Pak J Sci Ind Res, 14, 504 - 506.

ANDRASSY, K., HORVATH, I., LAKOS, T., TÖKE, Zs., 1980:

Mass incidence of mycotoxicoses in Hajdu-Bihar county.
Myk , 23, 130-133.

ARAGAKI M., 1961;

Radiation and temperature interaction on the sporulation of *Alternaria* tomato.
Phytopath, 51, 803 - 805.

ASHWORTH, L. J., GEORGE, A. G., 1971:

Stachybotrys atra: a cause of root disease of cotton.
Phytopath, 61, 1320.

AZAR, P., AQUAVELLA, J. V., SMITH, R. S., 1975:

Keratomycosis due to an *Alternaria* species.
Am J Ophth , 79, 5, 881 - 882.

*: Abkürzungen der Zeitschriften nach LEISTNER, O., 1981:

Internationale Titelauskürzungen (ITA)

Biblio Verlag Osnabrück

BAKER, G. E., 1968:

Fungi from the central pacific region.

Mycol , 60, 196 - 201.

BAMBURG, J. R., 1972:

The biological activities and detection of naturally occurring
12,13-epoxy-9-trichothecenes.

Clin tox, 5, 495 - 515.

BARRON, G. L., 1961:

Studies on species of oidioidendron, helicodendron, and Stachybotrys
from soil.

Can J Bot , 39, 1563 - 1571.

BARRON, G. L., 1962:

Stachybotrys aurantia sp. nov. from soil.

Can J Bot , 40, 257 - 261.

BARRON, G. L., 1964:

A note on the relationship between Stachybotrys and Hyalostachybotrys.

Mycol , 56, 313 - 316.

BARRON, G. L., 1968:

Genera of Hyphomycetes from soil.

The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

BARS, J. LE, GERARD, J. P., MICHEL, Ch., 1977:

Mise en evidence de la stachybotryotoxigene en France: Un cas
d'intoxication aigue chez des daims.

Ann Nutr Alim , 31, 509-507.

BATA, A., HARRACH, B., UJSZASZI, K., KIS-TAMAS, A., LASZTITY, R., 1985:
Macrocyclic trichothecene toxins produced by Stachybotrys atra strains
isolated in middle Europe.

Appl environ Microbiol , 49, 678 - 681.

BAWDEN, F. C., FREEMAN, G. G., 1952:

The nature and behaviour of inhibitors of plant viruses produced by
Trichothecium roseum LINK.

J Gen Microbiol, 7, 154-160.

BELL, R. G., 1975:

The development in beef cattle manure of *Petriellidium boydii* (Shear) Malloch, a potential pathogen for man and cattle.
Can J Microb , 22, 552 - 556

BENHAM, R. W., GEORG, L. K., 1948:

Allesheria boydii, causative agent in a cause of meningitis.
J Invest Dermatol , 10, 99-110.

BETINA, V., VANKOVA, M., 1977:

Trichothecin - an antibiotic, morphogenic factor, mycotoxin and bitter substance of apples.
Biol , 32, 943 - 949.

BHOWMIK, T. P., 1969:

Alternaria seed infection of wheat.
Plant Disease Reporter , 53, 77 - 80.

BISBY, G. R., 1943:

Stachybotrys.
Trans Brit Mycol Soc 26, 133-143.

BISBY, G. R., ELLIS, M. B., 1949:

Stachybotrys dichroa Grove.
Trans Brit Mycol Soc , 32, 158 - 161.

BLUNT, F. L., BAKER, G. E., 1968:

Antimycotic activity of fungi isolated from hawaiian soils.
Mycol , 60, 559.

BODON, L., PALUYSIK, M., 1970:

Cytotoxicity of toxic extracts from the fungus *Stachybotrys alternans*.
Acta vet' hung , 20, 289 - 294.

BONDIETTI, E., MARTIN, J. P., HAIDER, K., 1971:

Influence of nitrogen source and clay on growth and phenolic polymer production by *Stachybotrys* species, *Hendersonula to-ruloidea*, and *Aspergillus sydowi*.
Soil Sci Soc Am Proc , 35, 917 - 921.

BOTTICHER, W. W., 1966:

Alternaria as a possible human pathogen.

Sabouraudia , 4, 256.

BRESH, A. R., FRANK, H. K, 1985:

Untersuchungen an Mykotoxinen in der Bundesforschungsanstalt für Ernährung.

7. Nationaler Workshop, München.

BRIAN, P. W., HEMMING, H. G., 1946:

Production of antifungal and antibacterial substances by fungi:

Preliminary examination of 166 strains of fungi imperfecti.

Am J Bot , 33, 198 - 167.

BRIAN, P. W., DAWKINS, A. W., GROVE, J. F., HEMMING, H. G., LOWE, D.,

NORRIS, G. L. F., 1961

Phytotoxic compounds produced by *Fusarium equiseti*.

J exp Bot, 12, 1 - 12.

BULOCK, J. D., 1961:

Intermediary metabolism and antibiotic synthesis.

Adv Appl Microbiol , 3, 293-342.

BURGE H. A., SOLOMON W. R., BOISE J. R., 1976:

An appraisal of Impregnon as deterrent of domestic fungus growth.

J Allerg Clin Immunol , 58, 4, 491 - 499.

BURGE, H. P., BOISE, J. R., SOLOMON, W. R., BANDERA, E., 1977:

Fungi in libraries: an aerometric survey.

Mycop , 64, 67 - 72.

BURMEISTER, H. R., J.J., HESSELTINE, C.W., 1972

Survey for *Fusaria* that elaborate T-2 toxin.

Appl Microbiol , 23, 1165-1166.

BURROUGHS, R., SEITZ, L. M., SAUER, D. B., MOHR, H. E., 1976:

Effect of substrate on metabolite production by *Alternaria alternata*.

Appl environ Microbiol, 31, 685 - 690.

BUTT, Z. L., CHAFFAR, A., 1972:

Inhibition of certain human pathogenic fungi by *Stachybotrys atra*.
Pak J Bot, 4, 211 - 213.

BRUCKNER, B., HANEL I., HANEL F., TROGER R., 1983:

Einfluss von Phosphat auf die Bildung von Tentoxin durch *Alternaria alternata* Fr KEISSLER.
Z allg Mikrobiol , 239, 549 - 556.

CAMPBELL R., 1969:

An electron microscope study of spore structure and development
in *Alternaria brassicola*.
J Microbiol gen , 54, 381 - 392.

CAMPBELL, R., 1969:

Further electron microscopic studies of the conidium of *Alternaria brassicola*.
Arch Microbiol , 69, 60 - 68.

CAMPBELL, R., 1972:

Ultrastructure of conidium ontogeny in the deuteromycete fungus
Stachybotrys atra Corda.
New Phytol, 71, 1143 - 1149.

CARTER, C. J., CANNON, M., 1977:

Structural requirements for the inhibitory action of 12,13-epoxy-
trichothecenes on protein synthesis in eukaryotes.
Biochem J , 166, 399 - 409.

CHRISTENSEN, C. M., NELSON, G. H., MIROCHA, C. J., BATES, F., 1968:

Toxicity to experimental animals of 943 isolates of fungi.
Canc Res , 28, 2293 - 2295.

CHUNG, C. W., TRUCKSESS, M. W., GILES, A. L., FRIEDMAN, L., 1974:

Rabbit skin test for estimation of T-2 toxin and other skin-
irritating toxins in contaminated corn.
Journal of the AOAC, 57, 1121 - 1127.

COADY, A., 1975:

Human mycohepatotoxin problems of developing countries:
cirrhosis, cancer, and viral interactions: (A view from Africa).
Int J Envir Stud , 8, 213 - 216.

COLE, R. J., COX, R. H., 1981:

Handbook of toxic fungal metabolites.

Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco,
569 - 613.

COMSTOCK G. W., PALMER C. E., STONE R. W., GOODMAN N. L., 1974:

Fungi in the sputum of normal men.

Mycop , 54, 1, 55 - 62.

CROFT, W. A., JARVIS, B. B., YATAWARA , C. S., 1986:

Airborne outbreak of trichothecene toxicosis

Atmospheric Environment, 20, 3, 549-552.

CUNDCLIFFE, E., DAVIES, J. E., 1977:

Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic
protein synthesis by trichothecene fungal toxins.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 11, 491 - 499.

CURRAN, P. M. T., 1980:

The effect of temperature, pH, light and dark on the growth of fungi
from Irish coastal waters.

Mycol. 72, 360-358.

DANKO, Gy., TANYI, J., 1968:

On stachybotryotoxicosis of horses.

Magy Allatrov Lapja, 23, 225-229.

DIENER, U. L., WAGENER, R. E., MORGAN-JONES, G., DAVIS, N. D., 1976:

Toxogenic fungi from cotton.

Phytopath , 66, 514 - 516.

DIETZ, O., WIESNER, E., 1982:

Handbuch der Pferdekrankheiten für Wissenschaft und Praxis.

VEB Gustav Fischer Verlag Jena, DDR.

DOUPNIK, B., SOBERS, E. K., 1968:

Mycotoxycosis: toxicity to chicks of *Alternaria longipes* isolated from tobacco.

Appl Microbiol , 16, 1596 - 1597.

EDEL, B., BRÜCKNER, B., HANEL, I., TRÜGER, R., 1985:

Einfluss von Phosphat und Inhibitoren der Proteinsynthese auf das Wachstum und die Tentoxinbildung von *Alternaria alternata* (FR.) Keissler.

J Basic Microbiol , 25, 155 - 160.

EL-KADY, I. A., MOUBASHER, M. H., 1981:

Toxigenity and toxins of *Stachybotrys* isolates from wheat straw samples in Egypt.

Exp Mycol , 6, 25-30.

ELLIS M. B., 1971:

Dematiaceous Hyphomycetes.

Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

ELNAGY, M. A., EL - HISSY, F. T., SHOREIT, A. A., 1976:

Some nutritional and environmental factors affecting the growth of *Stachybotrys atra* and *Aspergillus ochraceus*.

Egypt J Bot , 19, 31 - 42.

ENGLISH, M. P., 1965:

The ecology of some keratinophilic fungi associated with hedgehogs.

New Zealand Med J , 63, 586 - 599.

EPPLEY, R. M., 1977:

Chemistry of stachybotryotoxycosis.

In: RODRIGKS, J. V., HESSELTINE, C.W., MEHLMANN, M.A.,

Mycotoxins in human and animal health.

Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 286 - 293.

EPPLEY, R. M., 1974:

Mycotoxins

Sensitivity of brine shrimp (*artemia salina*) to trichothecenes.

J of the AOAC, 57, 618 - 620.

FARMER, S. G., RICHARD, A., KOMOROWSKI, M. D., 1976:
Cutaneous microabscess formation from *Alternaria alternata*.
A J C P , 66, 565 - 569.

FLANNIGAN, B., 1974:
Distribution of seed-borne micro-organisms in naked barley and wheat
before harvest.
Trans Brit Mycol Soc , 62, 51 - 58.

FORGACS, J., CARLL, W. T.,
Mycotoxinoses.
In: BRANDLY, C.A., JUNGHER, E.L., 1962:
Adv vet Sci , 273 - 293.

FRANCA, F. D., CAREITO, G., 1984:
Keratinophilic fungi isolated from the air at Pavia.
Mycop , 85, 65 - 68.

FREEMAN, G. G., MORRISON, R. I., 1949:
The isolation and chemical properties of trichothecin an
antifungal substance from *trichothecium roseum* Link.
Biochem , 44, 1 - 5.

FREEMAN, G. G., 1955:
Further biological properties of trichothecin, an antifungal
substance from *Trichothecium roseum* Link and its derivatives.
J Gen Microbiol , 12, 213 - 221.

FUNDER, S., 1958:
Practical mycology. Manual for identification of fungi.
Broggers boktr. forlag, Oslo, Norway.

GAMS, W., 1971:
Cephalosporium-artige Schimmelpilze.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

GARI, M., FRUIT, J., ROUSSEAU, P., GARNIER, J. M., TRICHET, C.,
BAUDRILLART, J. C., COMTE, P., FEUCHERES, P., PINON, J. M., 1985:
Scedosporium (monosporium) *apiospermum*: multiple brain abscesses.
Sabouraudia , 23, 371-376.

GEDEK, B., 1972:

Biologischer Nachweis von Mykotoxinen.

Zbl Vet Med, 19, 15 - 32.

GEDEK, B., 1974:

Möglichkeiten und Grenzen der mikrobiologischen
Futtermittelkontrolle.

Dt tierärztl Ws , 81, 37 - 40 und 65 - 68.

GEDEK, B., 1980:

Kompedium der medizinischen Mykologie.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

GHAFFAR, A., PARVEEN, G., 1968:

Colonization of cotton roots by soil micro-organisms.

Mycop mycol appl, 38, 373-376.

GILGAN, M. W., SMALLEY, E. B., STRONG, F. M., 1966:

Isolation and partial characterization of a toxin from *Fusarium*
tricinctum and moldy corn.

Biochim biophys A , 114, 1-3.

GITTERMAN, C. O., 1965:

Antitumor, cytotoxic and antibacterial activities of tenuazonic acid
and congeneric tetramic acids.

J Med Chem , 8, 483.

GORDON, M. A., 1956:

Nutrition and sporulation of *Allescheria boydii*.

J Bacteriol , 73, 199-205.

GRAVESEN, S., 1978:

Identification and prevalence of culturable mesophilic microfungi
in house dust from 100 danish homes.

Allergy, 33, 268 - 272.

GRIFFIN, G. F., CHU, F. S., 1983:

Toxicity of the alternaria metabolites alternariol, alternariol
methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay.

Appl environ Microbiol , 46, 1420 - 1422.

GYONGYOSSY - ISSA, M. I. C., KHACHATOURIANS, G. G., 1984:

Interaction of I-2 toxin with murine lymphocytes.

Biochimica et Biophysica Acta, 803, 197 - 202.

HABERMEHL, G. G., BUSAM, L., 1984:

Mitoxin-A:A novel macrocyclic trichothecene from the brazilian plant *Baccharis coridifolia*.

Z Natforsch , 39, 212 - 216.

HAJTOS, I., HARRACH, B., SZIGETI, G., FODOR, L., MALIK, G.,

VARGA, J., 1983:

Stachybotryotoxicosis as a predisposing factor of ovine systemic pasteurellosis.

Acta Vet Hung , 31, 181 - 188.

HARRACH, B., BATA, A., BAJMOCY, E., BENKO, M., 1983:

Isolation of satratoxins from the bedding straw of a sheep flock with fatal stachybotryotoxicosis.

Appl environ Microbiol , 45, 1419 - 1422.

HARRACH, B., BATA, A., 1983:

The presence of verrucarins J, satratoxins G and H in samples of straw responsible for stachybotryotoxicosis in sheep and calves.

Proceedings of the International Mycotoxin Conference, Cairo, Egypt, 19th-24th march.

HARRACH, B., MIROCHA, J., PATHRE, S. V., PALLYUSIK, M., 1981:

Macrocyclic trichothecene toxins produced by a strain of *Stachybotrys atra* from Hungary.

Appl environ Microbiol , 41, 1428 - 1432.

HARVAN, D. J., PERO, R. W., 1976:

The structure of the *Alternaria* metabolites. In: RODRICKS, J. V., Mycotoxins and other fungal related food problems, *Advances in chemistry series 149*, Am chem Soc, Washington D.C., 344.

HILBRICH, P., 1978:

Krankheiten des Geflügels. Unter besonderer Berücksichtigung der Haltung und Fütterung. 3. Auflage.

Verlag Hermann Kuhn GMBH & KO. KG. Villingen - Schwenningen

HINTIKKA E.- L., 1977:

Stachybotryotoxycosis as a veterinary problem.

In: RODRICKS, J. V., HESSELTINE, C. W., MEHLMANN, M. A., Mycotoxins in human and animal health.

Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 277 - 284.

HINTIKKA, E.- L., 1977:

The genus *Stachybotrys*.

In: WYLLIE, T. D., MOREHOUSE, L. G., Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. An encyclopedic handbook.

Marcel Dekker, Inc. New York.

Stachybotryotoxikose in cattle and captive animals. Vol. III. S. 152 - 161.

Stachybotryotoxycosis in horses. Vol. III. S. 181 - 185.

Stachybotryotoxycosis in sheep. Vol. III. S. 203 - 207.

Stachybotryotoxycosis in swine. Vol. III. S. 268 - 272.

Stachybotryotoxycosis in poultry. Vol. III. S. 327 - 331.

Stachybotryotoxycosis in laboratory animals. Vol. III. S. 462 - 471.

Human Stachybotryotoxycosis. Vol. III. S. 87 - 89.

HINTIKKA, E.- L., 1983:

Toxicosis and natural occurrence of trichothecenes in Finland.

In: UENO, Y., Developments in food science.

HOLZAPFEL, C. W., STEYN, P. S., 1968:

The isolation and structure of a new diterpene lactone from *Trichothecium roseum* Link.

Tetrahed , 24, 3321 - 2228.

HAGGBLOM, P., 1981:

Production of alternariol and alternariol monomethyl ether and morphology of *Alternaria alternata*.

Trans Brit mycol Soc , 77, 185 - 187.

HAGGBLOM, P., UNESTAM, T., 1979:

Blue light inhibits mycotoxin production and increases total lipids and pigmentation in *Alternaria alternata*.

Appl environ Microbiol , 38, 1074 - 1077.

ICHINOE, M., 1970:

Japanese Hyphomycetes notes III.

Trans Mycol Soc , X, 3, 110 - 116.

IONITA, I., 1971:

Contributions of works of art and of historic monuments II. Species of fungi isolated from oil and tempera paintings.

Rev Roum Biol-Bot , 16, 377 - 381.

IRFAN, M., SHAGUFTA, S., BEGUM, S., CHAUDHRY, R.A., 1980:

Studies on deg nala disease in cattle and buffaloes.

Final technical research report, University of agriculture, College of Veterinary Sciences Lahore, Pakistan, 1 - 31.

JAIN, J. P., PATEL, P. N., 1969:

Studies on seed mycoflora of castor and its control.

Ind Phytopathol , XXII, 209 - 214.

JARMAI, K., 1929:

Viskosusseptikaemien bei älteren Fohlen und erwachsenen Pferden.

Dt tierärztl Ws , 33, 517.

JARVIS, B. B., 1971:

Factors affecting the production of mycotoxins.

J appl Bact , 34, 199 - 213.

JARVIS, B. B., MAZZOLA, E. P., 1982:

Macrocylic and other novel trichothecenes: their structure, synthesis, and biological significans.

Acc Chem Res , 15, 388 - 395.

JARVIS, B. B., MIDIWO, J. O., DE SILVA, I., 1981:

Verrucarín L, a new macrocylic trichothecene.

J Antibiot, 34, 120 - 121.

JARVIS, B. B., MIDIWO, J. O., TUTHILL, D., BEAN, G. A., 1981:

Interaction between the antibiotic trichothecenes and the higher plant *Baccharis megapotamica*.

Sci , 214, 460 - 462.

JARVIS, B. B., STAHLY, G. P., PAVANASASIVAM, G., 1980:

Antileukemic compounds derived from the chemical modification of macrocyclic trichothecenes. 1. derivatives of verrucaric acid.
J Med Chem , 23, 9, 1054 - 1058.

JOFFE, A. Z., 1964:

In: WOGAN, G. N., Mycotoxins in foodstuffs.
MIT Press, Cambridge, Mass., 77-85.

JOHNSON, G. R., SCHIEFER, B., PANTEKOEK, J. F. C. A., 1975:

Case report. Maduromycosis in a horse in Western Canada.
Can Vet J , 16, 341 - 344.

JOLY, P., 1964:

Le Genre *Alternaria*.
Editions Paul Lechevalier, Paris.

JONG, S. C., DAVIS, E. E., 1976:

Contribution to the knowledge of *Stachybotrys* and *Memnoniella* in culture.
Mycotaxon, III, 409 - 485.

KORPINEN, E.- L., 1973:

Studies on *Stachybotrys alternans*. I Isolation of toxigenic strains from finish grains and feeds.
Acta Path Microbiol Scand , 81, 191 - 197.

KORPINEN E.- L., 1974:

Studies on *Stachybotrys alternans*, IV. Effect of low doses of *Stachybotrys* toxins on pregnancy of mice.
Acta Path Microbiol Scand , Sect B, 82, 457 - 464.

KORPINEN E.- L., 1974:

Studies of *Stachybotrys alternans*
V. Comparison of rabbit skin, mouse fibroblast culture and brine shrimp tests as detectors of *stachybotrys* toxins.
Acta Path Microbiol Scand , Sect B, 82, 465 - 469.

KORPINEN, E.- L., KURKINEN, M., NUMMI, M., ENARI, T.- M., 1974:
Studies on *Stachybotrys alternans*
III. Chromatographic separation and tissue culture toxicity test
of *stachybotrys* toxins.
Acta Path Microbiol Scand , Sect B, 82, 7 - 11.

KORPINEN, E.- L., UOTI, J., 1974:
Studies on *Stachybotrys alternans*
II. Occurrence, morphology and toxigenicity.
Acta Path Microbiol Scand, Sect B, 82, 1 - 6.

KUMAGAI, T., 1983:
Action spectra for the blue and near ultraviolet reversible
photoreaction in the induction of fungal conidiation.
Physiol Plant , 57, 468 - 471.

KUMAGAI, T., ODA, Y., 1973:
Blue and near ultraviolet reversible photoreaction with intracellular
particulate fraction of the fungus, *Alternaria tomato*.
Plant & Cell Physiol , 14, 1107 - 1112.

KUPCHAN, S. M., JARVIS, B. B., DAILEY, R. G., BRIGHT, W., BRYAN,
R. F., SHIZURI, Y., 1976:
Baccharin, a novel potent antileukemic trichothecene triepoxide
from *Baccharis megapotamica*.
J Am Chem Soc , 98, 7092 - 7093.

LEACH, C. M., 1962:
Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation.
Can J Bot , 40, 151 - 161.

LEISTNER, L., AYERS, J. C., 1967:
Schimmelpilze und Fleischwaren
Fleischwirtschaft, 47, 1320.

LINNAINMAA, K., SORSA, M., ILUS, T., 1979:
Epoxytrichothecene mycotoxins as c-mitotic agents in *Allium*.
Hered , 90, 151 - 156.

LUKENS, R. J., 1963:
Photoinhibition of sporulation in *Altenaria solani*.
Am J Bot , 50, 720 - 724.

MAGAN, N., LACEY, J., 1985:

Interactions between field, and storage fungi on wheat grain.
Trans Brit Mycol Soc , 85, 29 - 37.

MAGAN, N., CAYLEY, G. R., LACEY, J., 1984:

Effect of water activity and temperature on mycotoxin production
by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain.
Appl environ Microbiol , 47, 1113 - 1117.

MARASAS, W. F. O., SMALLEY, E. B., 1977:

Mycoflora, toxicity and nutritive value of mouldy maize.
Onderstep J vet Res , 39, 1 - 10.

MARSH, P. B., BOLLENBACHER, K., 1946:

The vitamin requirements of *Memnoniella* and *Stachybotrys*.
Am J Bot 33, 245 - 249.

MARTIN J. P., HAIDER, K., 1969:

Phenolic polymers of *Stachybotrys atra*, *Stachybotrys chartarum*
and *Epicoccum nigrum* in relation to humic acid formation.
Soil Sci , 107, 260 - 270.

MATHUR, B. L., SANKHLA, H. C., 1966:

A new variety of *Stachybotrys atra* from Rajasthan soil.
Sci Ann , 93 - 94.

MAYR, A., BACHMANN, P. A., BIBRACK, B., WITTMANN, G., 1974:

Virologische Arbeitsmethoden 1.
Gustav Fischer Verlag, Jena.

McQUADE, A. B., 1963:

Morphogenesis and nutrition in the *Memnoniella* - *Stachybotrys* group
of fungi.
J gen Microbiol , 30, 429 - 43.

MAZEN, M. B., ABDEL - HAFEZ, S. J. J., SHABAN, G. M. M., 1984:

Survey of the mycoflora of egyptian wheat grains and their lemmae
and paleae.
Mycopath , 85, 155 - 159.

MERONUCK, R. A., STEELE, J. A., MIROCHA, J. J., CHRISTENSEN, C. M., 1972:

Tenuazonic acid, a toxin produced by *Alternaria alternata*.
Appl Microbiol , 23, 3, 613 - 617.

MIYAZAKI, W., TAMAOKA, H., SHINOHARA, M., KAISE, H., IZAWA, T.,
NAKANO, Y., KINOSHITA, I., HONG, K., INOUE, K., 1980:

A complement inhibitor produced by *Stachybotrys complementi*, nov.
sp. K-76, a new species of fungi imperfecti.
Microbiol Immunol , 24, 1091 - 1108.

MOUBASHER, A. H., MAZEN, M. B., 1972:

Dematiaceous Hyphomycetes in egyptian soils.
Trans Brit Mycol Soc , 59, 527 - 530.

MÜLLER, E., LOEFFLER, W., 1982:

Mykologie, Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New york.

NAGY, Z. A., PLYUSIK, M., BAMBERGER, K., 1970:

Comparative study of oral lesions associated with stachybotryo-
toxicosis and fowl pox. II Microscopic lesions.
Acta vet hung, 20, 171-182.

NAKAJIMA, S., 1973:

Studies on metabolites of phytotoxic fungi. I. Isolation of
macrosporin and 6-methylxanthopurpurin 3-methylether from
Alternaria bataticola Ikata ex Yamamoto.
Chem Pharm Bull , 21, 2083 - 2085.

NOSKOV, A. I., ORGYSKOV, S. E., 1967:

Zur Diagnostik der Stachybotriotoxikose der Rinder.
Trudy vses Inst vet Sanit 28, 21 - 27.

OHFF, R., WEIBACH, F., 1984:

Untersuchung über *Stachybotrys*-atrazin-Nachweis und Vorkommen auf
Futtermitteln in der DDR.
Mh Vet Med , 39, 628 - 631.

OZEGOVIĆ, L., PAVLOVIĆ, R., MILOSEV, B., 1971:

Toxic dermatitis, conjunctivitis, rhinitis, pharyngitis and laryngitis in fattening cattle and farm workers caused by mold from contaminated straw.

Veterinaria, 20, 263 - 267.

PALYUSIK, M., SZEP, I., SZOEKE, F., 1968:

Data on susceptibility to mycotoxins of day-old goslings.

Acta vet hung, 18, 363 - 372.

PALYUSIK, M., 1970:

Biological tests for the toxic substances of *Stachybotrys atra*.

Acta vet hung, 20, 1, 57-67.

PALYUSIK, M., BAMBERGER, K., NAGY, Z. A., 1970:

Comparative study of oral lesions associated with stachybotryotoxicosis and fowl pox. 1) Clinical symptoms and cross lesions.

Acta vet hung, 20, 2, 165 - 170.

PALYUSIK, M., RIFAI, P., 1973:

Anemia of piglets caused by stachybotryotoxin.

Magy Allatorv Lapja, 28, 609-611.

PALYUSIK, M., 1982:

Untersuchung über in Ungarn vorhandenen Pilze und ihre Trichothezene.

Aktuelle Probleme der landwirtschaftlichen Forschung, Bericht über das am 24. Oktober 1977 abgehaltene 4. Seminar, 19 - 27.

PAVLOV, P., DIMITROV, G., STANKOUSHEV, H., SURTMADJIEV, K., 1970:

On the problem of stachybotryotoxicosis in sheep.

Vet Sci, 4, 49 - 54.

PEDERSEN, B. N., MARDH, P.-A., HALLBERG, T., JONSSON, N., 1976:

Cutaneous alternariosis.

Brit J Dermatol, 94, 201 - 209.

PERLMAN, D., 1948:

On the nutrition of *Memnoniella* and *Stachybotrys atra*.

Am J Bot, 35, 36 - 41.

PERO, R. W., ROSNER, H., BLOIS, M., HARVAN, D., SPALDING, J. W.,
1973:

Toxicity of metabolites produced by the "Alternaria".
Environ Health Persp , 87, 87 - '94.

PEPELJNJAK, S., CVEJNIC, Z., 1984:

Distribution of moulds on stored grains in house holds in an area
affected by endemic nephropathy in Yugoslavia.
Mycop , 86, 83 - 87.

RANZONI, F. V., 1968:

Fungi isolated in culture from soils of the Sonoran desert.
Mycol , 60, 356 - 371.

REDDY, B. O., KELLEY, D. C., MINOCHA, H. C., ANTHONY, H. D.,
1974:

Pathogenicity of *Alternaria alternata* and its antibody production
in experimental animals.
Mycop mycol appl , 54, 3, 385 - 390.

REIB, J., 1981:

Mykotoxine in Lebensmitteln.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

RICHTER, H., 1975:

Zum Vorkommen von Schimmelpilzen und Hefen im Futter und Sperma von
Besamungsbullen. Untersuchungsmethoden zu ihrem Nachweis und die
mögliche Bedeutung von Schimmelpilzen und Hefen bei Befruchtungs-
störungen bisher unbekannter Genese.
Berl Münch tierärztl Ws , 88, 224 - 229.

RIFAI, M. A., 1964:

Stachybotrys bambusicola sp. nov.
Trans Brit mycol Soc , 47, 2, 269 - 272.

RIFAI, M. A., COOKE, R. C., 1966:

Studies on some didymosporous genera of nematode-trapping
Hyphomycetes.
Trans Brit mycol Soc, 49, 1, 147-168.

ROBESON, D. J., STROBEL, G. A., 1985:

The identification of a major phytotoxic component from *Alternaria macrospora* as ab-dehydrocurvularin.

J Nat Prod , 48, 139 - 141.

ROBISON, B. M., 1970:

Micro-fungi of sugar-cane roots and soil in Jamaica.

Trop Agric , 47, 23 - 29.

ROSENBERGER, G., DIRKSEN, G., GRÜNDER, H.- D., STÖBER, M., 1978:

Krankheiten des Rindes.

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg.

SARKISOV, A. H., KOROLEVA, V. P., KVASNINA, V. P., GREZIN, V. F., 1954:

Diagnosis of the fungal diseases in animals. Mycosis and mycotoxicosis. Kolos, Moscow, 84-91.

SAUER, D. B., SEITZ, L. M., BURROUGHS, R., MOHR, H. E., WEST, J. L., MILLERET, R. J., ANTHONY, H. D., 1978:

Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest.

J Agr Food Chem , 26, 1380 - 1383.

SAVAGE, S. M., MARTIN, J. P., LEITEY, J., 1969:

Contribution of humic-acid and a polysaccharid to water repellency in sand and soil.

Soil Sci Soc Am Proc , 33, 149-151.

SAVULESCU, A., LAZAR, V., 1971:

Considerations on the mycoflora of archives stores of Roumania.

Rev Roum Biol Bot , 16, 383-387.

SCHADLER, D. L., STEELE, J. A., DURBIN, R. D., 1976:

Some effects of tentoxin on mature and developing chloroplasts.

Mycopath , 58, 2, 101 - 105.

SCHIEFER, B., MEHNERT, B., 1965:

Maduromycose beim Pferd in Deutschland.

Berl Münch Tierärztl Ws 12, 230 - 234.

SCHMIDT, T., 1968:

Eine pilzliche Blattfleckenkrankheit an Margeriten, verursacht durch *Alternaria chrysanthemi* n.sp.

Pfl Schr Ber, 21, 13-20.

SCHNEIDER, D. J., MARASAS, W. F. O., DALE KUY, J. C., KRIEK, N. P. J., VAN SCHALKWYK, G.C., 1979:

A field outbreak of suspected stachybotryotoxicosis in sheep. Journal of the South African Veterinary Association, 73 - 81.

SCHULZE, W., BICKHARDT, K., BOLLWAHN, W., von MICKWITZ, G., PLONAIT, H., 1980:

Klinik der Schweinekrankheiten.

Verlag M&H Schaper, Hannover.

SCHUMAIER, G., DeVOLI, H. M., LAFFER, N. C., CREEK, R. D., 1963:

Stachybotryotoxicosis of chicks.

Poult Sci, 42, 70-74.

SCOTT, B., 1964:

Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products.

Mycopathol Mycol Appl, 25, 213 - 222.

SEITZ, L.M., SAUER, D.B., MOHR, H.E., BURROUGHS, R.,

PAUKSTELIS, J., 1975:

Metabolites of *Alternaria* in grain shorgum.

J Agr Food Chem, 23, 1.

SHREEVE, B. J., PATTERSON, D. S. P., 1975:

Mycotoxins.

Vet Rec, 11, 279 - 280.

SLIFKIN, M. K., 1973:

Studies of the toxicity of *Alternaria mali*.

Toxicol Appl Pharmacol, 19, 70.

SORSA, M., LINNAINMAA, K., ILUS, T., 1978:

Mycotoxin mutagenesis - mutagenic activity of some species of subarctic grain fungi.

Mutat Res, 53, 267.

SPICHER, G., 1981:

Schimmelpilze und Mykotoxine in Getreide.

In: REIB, J., 1981: Mykotoxine in Lebensmitteln

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

STANKOUSHEV, H., SURTMADJIEV, K., HRISTOVA, TOMOV, A., VULEV, V.,
1965:

Stachybotryotoxicosis in sheep.

Vet Sci , 2, 11 - 17.

STANKOUSHEV, Kh., IVANOV, I., SIMOV, I., SURTMADZHIEV, K., TOMOV,
T., 1965:

An outbreak of stachybotryotoxicosis in buffaloes.

Vet Med Nauki , 2, 113 - 120. (Summary auf Englisch.)

STEYN, P. S., RABIE, C. J., 1976:

Characterisation of magnesium and calcium tenuazonate from *Phoma sorghina*.

Phytochem , 15.

STINSON, E. E., BILLS, D. D., OSMAN, S. F., SICILIANO, J.,
CEPONIS, M. J., HEISLER, E. G., 1980:

Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples,
tomatoes, and blueberries.

J Agric Food Chem , 28, 960 - 963.

SUBRAMANIAN, C. V., 1972:

Conidial chains, their nature and significance in the taxonomy of
Hyphomycetes.

Curr Sci , 41, 43 - 49.

SZATHMARY, Cs. I., MIROCHA, C. J., PALYSIK, M., PATHRE, S. V., 1976:

Identification of mycotoxins produced by species of *Fusarium* and
Stachybotrys obtained from eastern Europe.

Appl environ Microbiol , 32, 579 - 584.

SOEDERHALL, K., SVENSSON, E., UNESTAM, T., 1978:

Light inhibits the production of alternariol and alternariol
monomethyl ether in *Alternaria alternata*.

Appl environ Microbiol , 36, 655 - 657.

TAL, B., ROBESON, D. J., BURKE, B. A., AASEN, A. J., 1985:
Phytotoxins from *Alternaria helianthi*: Radicinin, and the
structures of deoxyradicinol and radianthin.
Phytochem , 24, 729 - 731.

TKACHENKO, A. F., 1960:
Comparative data on stachybotriotoxicosis of the bison and the
hippopotamus (under zoological park conditions).
In: BILAJ, V. I., Mycotoxinoses of man and agricultural animals
U.S. Joint Publications Research Service, No. 7434, Washington
D.C., 187 - 195.

TOMSIKOVA, A., NOVACKOVA, D., 1970:
Zum Studium der opportunistischen Pilze. I. Pilzflora in der
Atmosphäre von Pilsen (CSSR) (Teil A).
Myk , 13, 589 - 602.

TURNER, W. B., 1975:
Biosynthetic origins of mycotoxins.
Intern J Environ Stud , 8, 159 - 164.

TURNER, W. B., ALDRIDGE, D. C., 1983:
Fungal metabolites II.
Academic Press Inc., New York, New York.

UENO, Y., 1983:
Trichothecenes—chemical, biological and toxicological aspects.
Kodansha Ltd., Elsevier, Tokyo, Amsterdam, Oxford, New York.

UENO, Y., 1977:
Mode of action of trichothecenes.
Ann Nutr Alim , 31, 885-900.

UENO, Y., NAKAJIMA, M., SAKAI, K., ISHII, K., SATO, N., SHIMADA, N., 1973:
Comparative toxicology of trichothec mycotoxins:
inhibition of protein synthesis in animal cells.
J Biochem , 74, 285-296.

VACHEV, V., DYAKOV, L., PEICHIV, P., TABAKOV, B., 1970:

Abortion caused by *Stachybotrys* toxin in swine.

Vet Sbir , 67, 7-10.

VAKALOUNAKIS, D. J., CHRISTIAS, C., 1985:

Blue-light inhibition of conidiation in *alternaria cichorii*.

Trans Brit Mycol Soc , 85, 285 - 289.

VAKALOUNAKIS, D. J., CHRISTIAS, C., 1983:

Interaction of light and temperature on the vegetative reversion of conidiophores in *alternaria cichorii*.

Can J Bot , 61, 626-630.

VAKALOUNAKIS, D. J., CHRISTIAS, C., 1981:

Sporulation in *alternaria cichorii* is controlled by a blue and near ultraviolet reversible photoreaction.

Can J Bot , 59, 626 - 628.

VESELY, D., VESELA, D., JELINEK, R., 1984:

Use of chick embryo in screening for toxin-producing fungi.

Mycop 88, 135 - 140.

WADHWANI, K., SRIVASTAVAM A. K., 1985:

Some cases of onychomycosis from North India in different working environments .

Mycop , 92, 149 - 155.

WAHLBERG, C., KORPINEN, E.- L., HENRIKSSON, K., 1973:

A suspected outbreak of *stachybotryotoxicosis* among european elk (*Alces alces*) in Helsinki zoo.

Verhandlungsbericht des XV. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zootiere. Kolmarden.

Akademie-Verlag, Berlin, 81 - 84.

WALSH, J. H., STEWART, C. S., 1971:

Effect of temperature oxygen and carbon dioxide on cellulolytic activity of some fungi.

Trans Brit Mycol Soc , 57, 1, 75 - 84.

WEI, R. D., SMALLEY, E. E., STRONG, F. M., 1972:
Improved skin test for detection of T-2 toxin.
Appl Microbiol, 23, 1029-1030.

WITKOWSKI, M., 1984:

Beitrag zur Analytik von Patulin und Alternaria-Toxinen in Obst
und Gemüseprodukten Diss. Technische Universität Berlin
Fachbereich Lebensmitteltechnologie und Biotechnologie.
Mvp Hefte 1 Max-von-Pettenkofer-Institut des Bundesgesundheitsamtes.

WRIGHT, G. L. T., DERRICK, E. H., 1975:

The role of allergens in the aetiology of asthma in Brisbane.
Med J Austr , 22, 375 - 380.

WYLLIE, T. D., MOREHOUSE, L. G., 1977:

Mycotoxic fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses
Marcel Dekker, Inc. New York.
Vol. 1.- 3.

YU, H., 1965:

Studies on fungi of the normal skin.
Acta Dermatologica , 60, 126.

ZUCK, R. K., 1946:

Isolates intermediate between Stachybotrys and Memnoniella.
Mycol , 38, 69 - 76.

Frau Prof. Dr. B. Gedek möchte ich für die Überlassung des Themas und ihre stets freundliche Unterstützung sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr will ich besonders für die mir bereitwillig gewährte Arbeitsmöglichkeit danken.

Herrn Dr. M. Gareis gilt mein Dank für seinen wertvollen Rat und die mir jederzeit gewährte Aussprache bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. J. Bauer danke ich herzlich für sein stetes Interesse und seine freundlichen Ratschläge.

Lebenslauf

Name: Kirsti, Kaarina Liukkonen

Geburtstag: 24.02.1957

Geburtsort: Helsinki, Finnland

Eltern: Maija-Leena Liukkonen, geb. Oksanen
Toivo, Olavi Liukkonen

Schul Ausbildung: 1964-1973 Deutsche Schule Helsinki
1973-1976 Töölön Yhteiskoulu
Abitur am 29.05.1976

Studium: Tiermedizinisches Studium an der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Abschluß: Staatsexamen am 23.12.1983

Promotionsstudium: Ab Juni 1984 am Institut für Medizinische
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchen-
medizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Unterschied

1. Die erste Gruppe (A) ist die Gruppe der

2. Die zweite Gruppe (B) ist die Gruppe der

3. Die dritte Gruppe (C) ist die Gruppe der

4. Die vierte Gruppe (D) ist die Gruppe der

5. Die fünfte Gruppe (E) ist die Gruppe der

6. Die sechste Gruppe (F) ist die Gruppe der

7. Die siebte Gruppe (G) ist die Gruppe der

